

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-503645

第6部門第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)4月21日

(51) Int.Cl. ³	識別記号	庁内整理番号	F I
G 0 1 N 33/53	V	8310-2 J	
C 1 2 Q 1/42		6807-4 B	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願平4-502401
 (86) (22) 出願日 平成3年(1991)12月9日
 (85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)6月14日
 (86) 国際出願番号 PCT/US91/09259
 (87) 国際公開番号 WO92/10585
 (87) 国際公開日 平成4年(1992)6月25日
 (31) 優先権主張番号 628, 282
 (32) 優先日 1990年12月14日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), AU, CA, JP

(71) 出願人 アデザ バイオメディカル コーポレーション
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94089, サニーベイル, エルコ ドライブ 1240
 (72) 発明者 セニエイ, アンドリュウ イー,
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 92675, サン ジュアン カピストラーノ, ヒルテ
 イップ ウェイ 30551
 (72) 発明者 テン, ネルソン エヌ, エイチ,
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94010, ヒルズボロー, ブルーベル レーン 24
 (74) 代理人 弁理士 宇井 正一 (外4名)

(54) 【発明の名称】 胎児制限抗原の決定のための試薬及びキット

(57) 【要約】

本発明は、正常な又は子宮外妊娠、妊娠の終結又は早期分娩及び膜の破壊の高まった危険性の検出のための方法、試薬及びキットに関する。個々の懸液は、腔腔からのサンプリング及び試験サンプルにおける特定の分析物の存在又は不在の決定を包含する。サンドイッチ又は競争アッセイ方法が使用され得る。上記アッセイのための試薬及び試薬キットが包含される。

浄書(内容に変更なし)

検 求 の 範 囲

1. 試験サンプルにおける胎児制限抗原の検出のためのキットであって:
 - a. 不溶性支持体に付着される抗-（胎児制限抗原）抗体: 及び
 - b. 抗-（胎児制限抗原クラス）抗体を含んで成るキット。
2. 前記抗-（胎児制限抗原）抗体がモノクローナル抗体である請求の範囲第1項記載のキット。
3. 前記抗-（胎児制限抗原）抗体が抗-（胎児フィブロネクチン）抗体である請求の範囲第1項記載のキット。
4. 前記抗-（胎児制限抗原クラス）抗体がポリクローナル抗体である請求の範囲第1項記載のキット。
5. 前記抗-（胎児制限抗原クラス）抗体が抗-フィブロネクチン抗体である請求の範囲第1項記載のキット。
6. 前記抗-（胎児制限抗原クラス）抗体がラベルされる請求の範囲第1項記載のキット。
7. 前記ラベルが酵素である請求の範囲第6項記載のキット。
8. 前記キットが、酵素基質をさらに含んで成る請求の範囲第1項記載のキット。
9. 前記キットが、正の対照をさらに含んで成る請求の範囲第1項記載のキット。
10. 前記キットが、サンプル濾過装置をさらに含んで成る請求の範囲第1項記載のキット。
11. 試験サンプルにおける胎児フィブロネクチンの検出のためのキットであって:
 - a. 不溶性支持体に付着される抗-（胎児フィブロネクチン）抗体: 及び

記載のキット。

25. 前記正の対照が既知胎児フィブロネクチン濃度の羊水である請求の範囲第24項記載のキット。
26. 前記胎児フィブロネクチン濃度が約10〜約100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である請求の範囲第25項記載のキット。
27. 前記羊水が、0.05Mのトリス緩衝液、pH 7.4、1%ウシ血清アルブミン、0.15Mの塩化ナトリウム、0.02%のアジ化ナトリウム、5mMのエチレンジアミン四酢酸、1mMのフェニルメチルスルホンフルオリド及び500 カリクレイン単位/ ml アプロチニンの溶液に希釈される請求の範囲第26項記載のキット。
28. 前記キットが負の対照をさらに含んで成る請求の範囲第11項記載のキット。
29. 前記負の対照が、0.05Mのトリス緩衝液、pH 7.4、1%ウシ血清アルブミン、0.15Mの塩化ナトリウム、0.02%のアジ化ナトリウム、5mMのエチレンジアミン四酢酸、1mMのフェニルメチルスルホンフルオリド及び500 カリクレイン単位/ ml アプロチニンの溶液である請求の範囲第28項記載のキット。
30. 前記キットが少なくとも1つのサンプル濾過装置をさらに含んで成る請求の範囲第11項記載のキット。
31. 前記サンプル濾過装置が予定された体積の濾過されたサンプルを分散する請求の範囲第30項記載のキット。
32. 前記キットがすすぎ用緩衝液をさらに含んで成る請求の範囲第11項記載のキット。
33. 前記すすぎ用緩衝液が0.02Mのトリス、0.08Mの塩化ナトリウム及び0.05%のTween-20である請求の範囲第32項記載のキット。
34. 前記すすぎ用緩衝液がアジ化ナトリウムをさらに含んで成る請求の範囲第33項記載のキット。

特 許 平 6-503645 (2)

- b. 抗-フィブロネクチン抗体を含んで成るキット。
12. 前記抗-（胎児フィブロネクチン）抗体がモノクローナル抗体である請求の範囲第11項記載のキット。
13. 前記抗-（胎児フィブロネクチン）抗体がFBC-6である請求の範囲第12項記載のキット。
14. 前記抗-フィブロネクチン抗体がポリクローナル抗体である請求の範囲第11項記載のキット。
15. 前記抗-フィブロネクチン抗体がラベルされる請求の範囲第14項記載のキット。
16. 前記ラベルが酵素である請求の範囲第15項記載のキット。
17. 前記酵素がアルカリホスファターゼである請求の範囲第16項記載のキット。
18. 前記キットが酵素基質をさらに含んで成る請求の範囲第17項記載のキット。
19. 前記酵素基質がフェノールフタレインモノホスフェートである請求の範囲第18項記載のキット。
20. 前記ラベルがコロイド状態である請求の範囲第15項記載のキット。
21. 前記不溶性支持体がマイクロタイタープレート、又はマイクロタイタープレートの壁のストリップを含んで成る請求の範囲第11項記載のキット。
22. 前記キットがマイクロタイタープレートカバーをさらに含んで成る請求の範囲第21項記載のキット。
23. 前記キットが、マイクロタイタープレートの壁のストリップを含み、そして前記ストリップのためのホルダーをさらに含んで成る請求の範囲第21項記載のキット。
24. 前記キットが正の対照をさらに含んで成る請求の範囲第11項

35. 前記すすぎ用緩衝液が濾過形でパッケージされる請求の範囲第33項記載のキット。
36. 前記図相が膜である請求の範囲第11項記載のキット。
37. 前記膜がナイロンである請求の範囲第36項記載のキット。
38. 前記膜が吸着層上に置かれる請求の範囲第36項記載のキット。
39. 流れ調節層が前記膜及び前記吸着層の中間に存在する請求の範囲第36項記載のキット。
40. 前記キットが、ラベルされた抗-フィブロネクチン抗体を含むサンプル濾過装置をさらに含んで成る請求の範囲第36項記載のキット。

胎児制限抗原の決定のための試薬及びキット

関連出願の相互参照

本願は、1988年11月16日付け出願の米国特許第07/274,268号、1988年9月15日付け出願の米国特許第07/244,969号、1988年11月18日付け出願の米国特許第07/274,267号、および1988年12月12日付け出願の米国特許第07/282,426号の一部継続出願である。上記出願の発明者はAndres E. SanyalおよびNelson E. B. Tsouである。これらの各出願は全体を本願に込込むものとする。

発明の技術分野

本発明は、正常妊娠と子宮外妊娠；妊娠の終了；および早期分娩と羊膜破裂の危険が増大していること；を免疫学的に検出するのに用いる試薬とキットに関する。

発明の背景

妊娠を決定する多種類の試験法が開発されている。商業的な妊娠の早期決定法には尿もしくは血清の検査法が含まれている。尿中のhCG(ヒト絨毛性ゴナドトロピン)を測定する家庭妊娠試験法としては、各種の酵素検査法、血球凝集阻止反応法、および月経が停止してから7日間までの間に妊娠を指示するのに有効な抗体インジケータを用いた試験法がある。特に、子宮外妊娠のような異常妊娠を決定するには医師による確認が推奨される。

hCGは胎児栄養層によって産生され、胎盤中の絨毛膜を通じて胎児血液から母体の血液へと流れる。母体の血液と尿中のhCGの

ていない場合は、子宮外妊娠の可能性を示している。自然流産の指示物質と関連がある受胎産物が子宮腔産物中に存在することによって流産が確認され、一方このような物質が存在しない場合は妊娠が継続していることを示している。胎盤由来の試験試料中に胎児関連抗原が存在することを測定する通常の免疫検査法は、これらの試料が一般に母体の血液を含有しているため、受胎産物が存在することを指示するには確実ではない。妊娠抗原と胎児抗原は、通常、胎児と胎盤の組織中のみならず母体の血液にも存在している。

早期出産が迫っていることを決定することは、早期出産児の新生児生存を増大させるのに重要である。羊膜の破裂を検出することは、真の分娩と類似分娩を識別するのに重要である。羊膜の破裂が小さくかつ羊水の漏出量が少ない場合は羊膜破裂が検出されない場合が多い。破裂した羊膜を検出する方法で確認されている方法は、主観的であり、感度が不十分でかつ特異的でない。妊娠28週間後、早期分娩および羊膜破裂の危険が増大していることを検出する本発明の実施態様は、後部円蓋、子宮頸管、または子宮頸管の近傍から取出した試験試料の検査法に関する。

発明の要約

本発明の方法は、妊娠の存在および/または状態を決定するのに用いる。本発明の方法は、腔腔由来の試料中に診断指示物質が存在することを決定するのに用いられ、下記の方法で構成されている。すなわち、

(a) 子宮頸管または子宮頸管の近傍の試験試料を採取し、次いで試料中に胎児制限抗原が存在することを決定することからなる妊娠の最初の20週間中に正常な子宮妊娠を決定する方法；

濃度は約3週間後から検出可能になる場合が多い。血清もしくは尿のhCG試験法の感度は、産生されるhCGの量が胎児栄養層組織の量および母体の血液中のhCGを希釈することによって測定されるので、制限がある。β-hCGに特異的に結合する抗体が開発されるまでは、LH(黄体化ホルモン)との交差反応があるので感度のレベルに制限がある。

本発明の発明者らは、子宮頸管、子宮頸管もしくは腔の後部円蓋、好ましくは外頸子宮頸管もしくは腔の後部円蓋の近傍から取出した試料を、胎児制限抗原、すなわち胎盤組織で産生されかつ実質的な量では母体の血液中に検出されない化合物もしくは物質の存在について試験することによって、正常な子宮妊娠を、妊娠サイトル中、早期に、確実に決定できることを発見したのである。この種の抗原としては胎児フィブロネクチンがある。

本発明の発明者らは、子宮頸管もしくは子宮頸管の近傍から取出した試料を、胎児制限抗原(fetal restricted antigen)、すなわち胎盤組織で産生され、実質的な量では母体の血液に検出されない化合物もしくは物質の存在について試験することによって、子宮外妊娠を決定できることを発見した。この種の物質としては胎児フィブロネクチンが含まれる。血液もしくは尿による妊娠試験によって妊娠について陽性という試験結果が得られた被検査者の試料中の胎児制限抗原が著しく少ない場合は、子宮外妊娠を示している。

治療的流産または自然流産中に排出される子宮腔産物中の、受精によるex vivo産物の存在を決定することは、子宮妊娠の存在とその終了を確認しかつ子宮外妊娠が存在しないと判定するのに極めて重要である。母体の血清または尿中の胎児関連抗原の濃度が妊娠を示し、かつ治療的流産中に排出された子宮腔産物が受胎産物を含有し

(b) 妊娠の最初の20週間中、妊娠患者から子宮頸管または子宮頸管の近傍の試験試料を採取し、次いで試料中に胎児制限抗原が存在しないことを決定することからなる早期妊娠を決定する方法；

(c) 子宮から卵巣もしくは取出された試験試料を採取し、次いで試料中に胎児制限抗原が存在することを決定することからなる受胎のex vivo産物を決定する方法；または

(d) 妊娠してから20週間後、患者から後部円蓋、子宮頸管または子宮頸管の近傍の試験試料を採取し、次いで試料中に胎児制限抗原が存在することを決定することからなる早期分娩もしくは胎児限

破産の危険が増大していることを決定する方法である。本発明の検査法で使用する試薬としては、標準付および標準なしの抗(被抗体)抗体類すなわち抗(胎児フィブロネクチン)抗体類のような抗(胎児制限抗原)抗体類；抗(被抗体クラス)抗体類すなわち抗(フィブロネクチン)抗体類のような抗(胎児制限抗原クラス)抗体類などがある。本発明の検査法で使用する他の試薬としては、抗(被抗体)抗体類すなわち抗(胎児フィブロネクチン)抗体類のような抗(胎児制限抗原)抗体類；抗(被抗体クラス)抗体類すなわち抗(フィブロネクチン)抗体類のような抗(胎児制限抗原クラス)抗体類などを付着させた不溶性の支持体がある。標準付もしくは標準なしの試薬の胎児制限抗原も本発明の試薬である。本発明の検査法で使用する試薬には、試薬被抗体を付着させた不溶性支持体、すなわち胎児制限抗原を付着させた不溶性支持体も含まれる。本発明の検査法で使用する試薬には、標準付二次抗体のような免疫検出試薬、および洗浄緩衝液も含まれる。

本発明には、上記試薬の中の1つのみ、他の試薬を組み合わせたり、または試料調製用剤のような補助物を組み合わせたりしたキットが含ま

れる。試験物は、キット中に、適切ないかなる形態に入っているとしてもよく、例えば容器、包装物などの形態でもよい。

発明の経緯と説明

妊娠の存在および/または状態を決定する本発明の方法は、膣腔から取出された、後部円蓋、子宮頸管または子宮頸部の、特に子宮頸管もしくは子宮頸部の近傍の試験試料中、胎児制限抗原の存在を決定することからなる方法である。本発明の具体的な実施態様は、正常な子宮妊娠、子宮外妊娠、治療的もしくは自然の流産の発生、および早期分娩もしくは早期破裂の危険が増大していることを決定するのに利用される。

本発明の方法を実施するのに有用な試薬とキットについても説明する。

胎児制限抗原検出法と試薬

胎児制限抗原試験法は、後部円蓋、子宮頸管または子宮頸部の近傍の取出された試験試料中の胎児制限抗原、すなわち特に胎児もしくは胎盤にのみ産生した物質の検出を行う。本発明の発明者らは、検出可能な量のこれらの物質が上記の試料中に存在するというものを発見した。胎児制限抗原は、母親の血漿中には有意な量で存在しないので、試料中に母親の血液が存在していても試験は妨害されない。

本願で用いる“胎児制限抗原”という用語は、胎児もしくは胎盤にのみ由来する物質であって、母親の血清、血漿もしくは尿中には存在しないか、または母親の血清、血漿もしくは尿中に有意な量で存在しない物質を意味すると定義する。この定義に合致するいずれの物質も、上記用語の意味の範囲内に含まれることを意味し、こ

れらの物質としては、免疫原性の物質とタンパク質、および純品の形態では免疫原性ではないが、それらに対して特異的もしくは選択的な抗体と選択的に結合できる後得のエピトープを有する他の物質の両者が含まれる。胎児制限抗原の例は、B. Nakamura and S. Nakamura, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82巻, 6517-6521頁, 1985年に報告されたFDC-6モノクローナル抗体と特異的に結合する胎児フィブロネクチンである。またFDC-6抗体を産生するハイブリドーム (the American Tissue Culture Collectionに受託番号ATCC 899018で寄託されている) の製造は、1990年1月16日付けでNakamuraらに発先された米国特許第4,894,326号に詳細に記載されている。

本願で用いられる“胎児制限抗原クラス”という用語は、胎児制限抗原がメンバーである抗原群のクラスもしくはグループを意味すると定義する。例えば、胎児フィブロネクチンは、ヒトフィブロネクチンのグループもしくはクラスの胎児制限抗原メンバーである。

本願で用いる“抗体”という用語は、クラスIgG, IgM, IgA, IgDおよびIgEの抗体、ならびに抗体のフラグメントであるFabおよびFab'を含む、優先的に結合する、抗体のフラグメントとハイブリッドの抗原体を含むと定義する。抗体はモノクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。本発明の検定法に使用するには、一般にモノクローナル抗体の方が好ましい。

免疫学的方法は、特異性を有するので本発明の検定法を実施するのに最も便利である。本願で用いる“免疫検定法”という用語は、抗原のエピトープと優先的に結合する第2物質 (すなわち結合パートナー、つまり通常は抗原結合部位を有する抗体もしくは抗体フラグメント) と抗原が優先的に結合することを利用する方法を意味すると定義する。本願で用いる優先的結合という用語は、選択的および/または特異的であり、かつ交差反応性の非特異的結合が一般に10

%より少なく好ましくは5%より少ない結合パートナー間の結合を意味する。例えば、被検体が胎児フィブロネクチンの場合、抗(胎児フィブロネクチン)抗体は、成人のフィブロネクチン類との交差反応性は10%より小さく、好ましくは5%より小さい。

限定されないが上記のステップを含むすべての検定法は本発明の適用範囲に含まれる。その検定法には、例えばサンドイッチ、競合、計量法(dipstick)装置、沈降、トランジスタブリッジプローブ、粒子選別、光散射、光散乱、および超音波プローブによる免疫検定法が含まれる。適切な免疫検定法は、標識として、例えば放射線同位元素標、酵素標、または蛍光標、クロモゲン原性もしくは化学発光性の物質を使ってもよい。

検定される試料は、後部円蓋、子宮頸管または子宮頸部の近傍から取出し、その試料を検定して、試料中に胎児制限抗原が存在することまたはその量が決定される。検出物が存在することを決定する方法が好ましい。試料は一般に液体と粒状固体を含有し、もしくは子宮頸部の粘液、もしくは子宮頸部の他の分泌物、細胞もしくは細胞の破片、羊水、または胎児もしくは母親の胎の物質を含有している。試料は、ダクトンなどの繊維型先端を有するスワブ、アスピレータ、吸引用具、洗浄用具などで取出され、適切な容器に移して保管し試験室に送られる。

試験試料は、試料として採取された組成物中では不安定で敏感なタンパク質の被検体を保護する液体中に分散させておくことが大切である。貯蔵と移送に用いる媒体は、貯蔵と移送中にタンパク質の被検体の速度が低下するのを防止しなければならない。貯蔵と移送に用いる適切な保存液は、0.05Mトリス-HCl, pH 7.4; 0.15M NaCl; 0.02% NaN₃; 1% BSA; 500 カリクレイン単位/mlのアプロタニン; 10Mフェニルメチルсульホニルフルオリド(PMSF); お

よび5mM EDTAで構成され、1990年4月24日に発行された米国特許第4,919,889号に記載されている。上記の媒体は、胎児フィブロネクチンを検出する際に最も好ましい試料稀釈液である。

胎児制限抗原の検出は、試験試料中の胎児制限抗原を、胎児制限抗原のエピトープと優先的に結合する抗体と結合させ、次いでこの結合反応があるかないかを決定することによって達成することができる。

胎児制限抗原の1つのサンドイッチ検定法では、試験試料を、抗(胎児制限抗原)抗体を付着させた不溶性支持体と接触させて、試料中の胎児制限抗原を不溶性支持体に結合させる。次にその不溶性支持体を、二次抗体である標識なしまたは標識付きの抗(胎児制限抗原)抗体と接触させると、その抗体は不溶性支持体に付着している胎児制限抗原と結合し、増強された胎児制限抗原が検出測定される。

被検体の胎児制限抗原を含むクラスの物質と結合する抗体は、特異的な抗(胎児制限抗原)抗体標識抗体または特異的な抗(胎児制限抗原)抗体サンドイッチング抗体の代わりに用いることができる。例えば、抗(胎児フィブロネクチン)抗体は不溶性支持体に付着させることができ、および標識付きもしくは標識なしの抗(フィブロネクチン)抗体は、増強された抗原を検出するのに使用することができる。あるいは、抗(フィブロネクチン)抗体は不溶性支持体に付着させることができるので、標識付きもしくは標識なしの抗(胎児フィブロネクチン)抗体は、増強された抗原に標識を付けるのに使用される。抗(胎児制限抗原)抗体は、増強抗体として使用して、胎児制限抗原が、そのクラスの他の抗原に比較して、試料中に少量しか存在していないときに確実に検出することが好ましい。

二次抗体は、不溶性支持体上で直接測定することができる物質的

に検出可能な濃度をもっていてもよい。あるいは二次抗体は濃縮なして、その場合、その二次抗体は、不溶性支持体を、二次抗体と選択的に結合する濃度付きの抗体もしくは抗体フラグメント（すなわち三次抗体）と接触させ、未結合の濃度付き三次抗体を支持体から除去、次いで不溶性支持体上の濃度の存在を測定することによって測定することができる。膜ろ液を用いるサンドイッチ免疫検定法を使用するのが適切である。

また試料は、組合免疫検定法で試験することもできる。この場合、試験試料は濃縮を付けた試薬である抗体もしくは抗原と混合し、次いで抗（胎児制限抗原）抗体もしくは試薬の胎児制限抗原が付着している不溶性支持体とともにインキュベートして、試薬間に試料抗体との結合について組合を起させる。このような免疫検定法を達成する方法と手順は、免疫検定法の技術分野の当業者によく知られている。最終的に、不溶性支持体に付着しているか、または溶液中に残っている濃度を測定する。

抗（胎児制限抗原）抗体は、胎児制限抗原類、好ましくは高度に精製した胎児制限抗原から、通常の抗血清法またはモノクローナル法で得ることができる。本発明は、本願では、明確にするために、胎児制限抗原としての胎児フィブロネクチンの検出について述べるが、これには限定されることなく、いずれの胎児制限抗原の検出法も本発明の適用範囲内にあることを意味する。胎児フィブロネクチンは、Engvall and Ruoslahti, *Int. J. Cancer*, 20 巻, 1-5 頁, 1977年に記載されているようにして羊水から精製される。抗（胎児フィブロネクチン）抗体は、胎児フィブロネクチンから、通常の抗血清法またはモノクローナル抗体法によって製造することができる。

モノクローナルとポリクローナルの両方の抗（胎児制限抗原）抗体類、または抗（胎児制限抗原クラス）抗体類は、胎児制限抗原類、

好ましくは高度に精製された抗原類から、通常の抗血清法またはモノクローナル法で製造することができる。

本発明の検定法に有用な主要な抗体は、抗体の IgG と IgM であるが、抗体の IgD, IgE および IgA も充分な量で入手できれば使用できる。使用時これらの抗体は、Nishii and Shilei, *SELECTED METHODS IN CELLULAR IMMUNOLOGY*, San Francisco Freeman, 1980 年; Goding, J., *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE*, New York: Academic Press, 111-114 頁, 1983 年および Parikh, C. A. JR (1985 年 8 月 26 日) に記載されているような通常のアフィニティークロマトグラフィーを用いてアフィニティー精製される。

本発明のネットと方法に使用するのに適した優先的に結合する抗体フラグメントは、それぞれのモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体から、通常の酵素学的または化学的フラグメント化法によって製造することができる。適切な方法は、例えば Tijssen, P., *LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: PRACTICE AND THEORIES OF ENZYME IMMUNOASSAYS*, New York: Elsevier 1985 年に記載されている。

ポリクローナル抗（胎児制限抗原）抗体は、ウサギ、モルモット、ラットまたはヤギのような動物を、胎児フィブロネクチンのような胎児制限抗原の濃縮物で免疫化し、その免疫化された動物から血清を取り出し、次いで例えば硫酸アンモニウム沈降法によって血清液から免疫グロブリン類を分離することによって得ることができる。

アフィニティークロマトグラフィーに用いるのに適切な吸収剤としては、胎児制限抗原の抗体が共有結合する蔗糖アガロースと細胞ポリアクリルアミド類が挙げられる。成人フィブロネクチンと交差反応を行う抗体を除くために、抗体の血清は、成人フィブロネクチンを結合させるカラムを通過させる。残留抗体を含有する溶液の

一部を次いで胎児フィブロネクチンのカラムを通過させ、次いで得られてアフィニティー精製がなされた抗体を得ることができる。

これらの手順では、リン酸緩衝食塩水溶液による抗体溶液をカラムに加え、次いでその抗体を 2.5 M NaSCN 溶液 pH 8.0 で洗脱することができる。所望により、抗体の濃縮は、減圧透析法もしくは限外濾過法によって実施することができる。抗体の濃縮は 4℃ 以下の温度では安定である。所望の分離と純度が得られるまでカラム分離法を繰返し続ける。

胎児フィブロネクチン抗原と抗体類を製造するために、H. Natsura and S. Nakamori, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 巻, 6517-6521 頁, 1985 年に記載されている手順を、その胎児フィブロネクチンの代わりに胎児フィブロネクチンを用いて実施してもよい。最も好ましい抗（胎児フィブロネクチン）抗体は、the American Type Culture Collection に受託番号 ATCC HB 9019 で寄託され、1990 年 1 月 16 日付で Natsura らに付与された米国特許第 4,894,328 号に記載されているハイブリドーマによって製造される。そのモノクローナル抗体は F8C-6 と命名されている。上記ハイブリドーマの培養と、免疫検定法に使用する抗体の製造については実施例で詳細に述べる。

ポリクローナルとモノクローナルの両方の抗（胎児制限抗原クラス）抗体は一般によく知られており、市販されているか、または公けに入手できるハイブリドーマの寄託品から入手できる。例えば抗（フィブロネクチン）モノクローナル抗体類は、ATCC HB 91 (American Type Culture Collection, Rockville MD 米国) 由来のクローン試料から製造することができる。他のこのような抗体類は、日本特許第 60091264 号 (DIALOG database file 35), WPI Acc. No. 85-161617/27) および米国特許第 4,325,867 号に記載されている。ポリクローナル抗フィブロネクチン抗体類をヤギとウサギ中に製造

する好ましい手順は実施例で述べる。

サンドイッチ免疫検定法：試料中の胎児制限抗原を測定する本発明のサンドイッチ法の実施態様では、抗（胎児制限抗原）抗体を付着させた不溶性支持体を、水性緩衝液中で希釈した試験試料と充分な時間接触させて、試験試料中の胎児制限抗原を、不溶性支持体上の抗（胎児制限抗原）抗体と結合させ、次いで支持体から試料が取出される。適切な免疫検定法の濃度は公知であり、pH が 6-8 好ましくは 7.2-7.6 のリン酸緩衝液 (PBS) のような緩衝液が挙げられる。試料は、先に述べた試料希釈液で希釈する方が好ましい。インキュベーション時間は実質的な結合を起させるのに充分な時間でなければならず、その時間は温度依存性である。適切なインキュベーション時間は 16-40℃ の範囲内の温度下で 30-240 分間であり、好ましい接触時間は 20-25℃ の範囲の温度下で少なくとも 60 分間である。

次に懸濁試料溶液を、リン酸溶液を用いて支持体から取出す。通常のリン酸溶液を使用することができる。適切なリン酸溶液は米国特許第 4,328,267 号に記載されている。そのリン酸溶液は、リン酸のモル濃度が 0.0001-0.05 で、pH が 6-8 で、0.001-0.1 重量 % の非イオン界面活性剤を含有する水性リン酸緩衝液である。適切な非イオン界面活性剤としては、ポリオキシエチレンエーテル類（ラウリル、セチル、オレイル、ステアリルおよびトリデシルのポリオキシエチレンエーテル類のようなもの）；ポリオキシエチレンソルビタン類（ポリオキシエチレンソルビタールのモノラウレート、モノパルミテート、モノステアレート、モノオレエートおよびトリオレエート）；および他のポリオキシエチレンエーテル類（例えば 18170H）が挙げられる。好ましい非イオン界面活性剤としては、40 のエタレンオキシド単位を有するオクタフルノキシポリエーテル

ユタノール (Triton X-405, Bohm and Hess Company) およびポリオキシエチレンソルビタールモノラウレート (Tween 20, Sigma Chemical Company から市販されている) がある。最も好ましいリンス溶液は、0.02M トリス、0.08M 塩化ナトリウム、0.05% Tween-20 および 0.02% アジ化ナトリウムを含有する溶液である。

次に不溶性支持体を、その支持体上の捕獲された胎児制限抗原と結合する抗体、すなわちサンドイッチング抗体と接触させる。このサンドイッチング抗体は、抗(胎児制限抗原)抗体でもよく、または抗(胎児制限抗原クラス)抗体でもよい。このサンドイッチング抗体は標識付きまたは標識なしでもよい。標識なしのサンドイッチング抗体を使用する場合は、サンドイッチング抗体と結合し、かつ物理的に検出可能な標識を有する三次抗体を通常の方式で用いてサンドイッチング抗体を測定することができる。

ここで各種の標識について述べる。明確にするために、限定することなく、工程の次のステップでは、酵素、好ましくはクロモゲン原性もしくは蛍光原性の酵素で標識をつけた抗(胎児制限抗原)抗体について述べる。“クロモゲン原性酵素”という用語は、本願では、適切な基質によって発色団産物を生成する酵素を意味すると定義する。“蛍光原性酵素”という用語は、本願では、適切な基質によって発光団産物を生成する酵素を意味すると定義する。

上記のサンドイッチング抗体は、水溶液で不溶性支持体に加える。その溶液は、反応物を保護し、結合反応を容易にするのに適した塩類と緩衝剤類を含有する方が好ましい。例えばその溶液は、ウシ血清アルブミン (BSA)、リン酸緩衝液 (PBS)、および上記のリンス溶液中に用いたポリオキシエチレンソルビタールエステルのような界面活性剤を含有していてもよい。酵素結合抗体に対する好ましい濃度は、0.05M トリス緩衝液 pH 7.2、2% D-ソルビトール、

2% BSA、0.1% アジ化ナトリウム、0.01% Tween-20、1mM 塩化マグネシウム、および 0.1% 塩化亜鉛からなる緩衝剤である。

インキュベーションは、サンドイッチング抗体を、存在している場合に不溶性支持体に付着している露出胎児制限抗原のエピトープと結合させるのに十分な時間続ける。好ましいインキュベーションの時間と温度は、不溶化試料の抗(胎児制限抗原)抗体と試験試料の胎児制限抗原との結合について先に述べたのと同じである。

次にサンドイッチング抗体溶液を不溶性支持体から除き、次いで支持体を先に記載したようなリンス溶液ですすぎ洗っている未結合物質を除く。

サンドイッチング抗体に標識を付けていない場合、サンドイッチング抗体と選択的に結合する、酵素で標識を付けた抗体などの結合試薬を、水溶液にして、不溶性支持体に加える。その溶液は、反応物を保護しかつ上記のような結合反応を容易にする適切な塩類と緩衝剤類を含有している方が好ましい。インキュベーションは、標識を付けた抗(サンドイッチング抗体)抗体が、存在している場合不溶性支持体に付着しているサンドイッチング抗体の露出エピトープと結合できるように十分な時間続ける。好ましいインキュベーションの時間と温度は、不溶化試料の抗(胎児制限抗原)抗体と試験試料の胎児制限抗原との結合について述べたのと同じである。

次に標識を付けた抗体溶液を不溶性支持体から除き、次いでその支持体を上記のようなリンス溶液でリンスし、残置している未結合の標識付き物質を除く。

次のステップでは、不溶性支持体を、酵素の存在下で反応を受ける基質の水溶液と接触させて、溶液中に蛍光化合物またはクロモゲン化合物を放出させる。適切な基質と、その基質を交換させることができる酵素とは、例えば米国特許第4,150,496号と同第4,528,267

号に記載されている。支持体は 10^{-1} ~ 10^{-10} モル濃度の基質を含有する基質水溶液と接触させる。 10^{-6} ~ 10^{-10} の基質のモル濃度が好ましい。基質溶液に加える好ましい試薬と緩衝剤としては例えば 2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール緩衝剤と塩化マグネシウムがある。

上記の基質溶液は、発色光団もしくは発色団を生成する反応が起こるのに十分な時間、不溶性支持体とともにインキュベートする。18 ~ 40℃ の温度下で、5 ~ 240 分間のインキュベーション時間を使用できる。20 ~ 25℃ の範囲内の温度と 10 ~ 90 分間のインキュベーション時間が好ましい。

次に溶液中の発色光団もしくは発色団のレベルを測定する。基質溶液中の発色光団もしくは発色団のレベルを測定するのに用いる装置と手順は、当該技術分野で従来用いられているものと同じである。溶液中の発色光団もしくは発色団のレベルは、不溶性支持体上の酵素濃度の関数であるが、この酵素の濃度は既に試験試料中の胎児制限抗原の量の関数である。試験試料中の胎児制限抗原の濃度は、上記溶液中の発色光団もしくは発色団のレベルを、既知の濃度の胎児制限抗原を含有する対照溶液で得られたそれぞれの発色光団もしくは発色団のレベルと比較することによって測定することができる。バックグラウンドとは統計的に有意に異なる濃度の胎児制限抗原を含有する対照を用いることが好ましい。胎児フィブロネクチンについては、対照は、既知濃度の胎児フィブロネクチンを含有する羊水であり、その羊水は、所望により、使用する前に精製してもよい。その胎児フィブロネクチンの濃度は、約 1 ~ 約 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間を変動してもよく、好ましくは約 10 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で最も好ましいのは約 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。対照の吸光度より大きいかまたは等しい吸光度を有する試料は陽性とみなされる。好ましいサンドイッチング法に

ついては実施例で詳細に述べる。

サンドイッチング法は、胎児制限抗原クラス結合抗体を、捕獲抗体または好ましくはサンドイッチング抗体として用いるために改変することができる。これらの実施態様では、抗(フィブロネクチン)抗体のような抗(胎児制限抗原クラス)抗体を不溶性支持体に付着させ、次に標識付きもしくは標識なしの抗(胎児制限抗原)抗体をサンドイッチング抗体として加える。好ましくは、抗(胎児制限抗原)抗体は不溶性支持体に付着させ、標識付きもしくは標識なしの抗(胎児制限抗原クラス)抗体は捕獲抗体をサンドイッチするのを用いる。

メンブラン免疫検定法：試験試料中の胎児制限抗原を測定する本発明のメンブラン法の実施態様では、抗(胎児制限抗原)抗体を付着させた不溶性支持体を、試料中の胎児制限抗原と不溶性支持体上の抗(胎児制限抗原)抗体とを結合させるのに十分な時間、pH が 8 ~ 8.5 好ましくは 7.2 ~ 7.6 のリン酸緩衝液 (PBS) のような水性緩衝液で希釈した試験試料と接触させる。結合させるのに必要な時間は、流動系では非常に短い。適切なインキュベーション時間は、15 ~ 40℃ の範囲内の温度下で 1 秒 ~ 20 分間で、好ましい接触時間は 1 分より短く、10 秒 ~ 2 分間が最適である。

次に不溶性支持体を、不溶性支持体上の捕獲された胎児制限抗原と結合する抗体、すなわちサンドイッチング抗体と接触させる。このサンドイッチング抗体は標識付きまたは標識なしでもよい。標識なしのサンドイッチング抗体を使用する場合は、このサンドイッチング抗体と結合しかつ物理的に測定可能な標識を有する三次抗体を、通常の方式で用いてサンドイッチング抗体を測定することができる。

ここで各種の標識について述べる。明確にするため、限定することなく、酵素好ましくは蛍光原性もしくはクロモゲン原性の酵素

で標識を付けた抗(胎児制限抗原)抗体について、工程の次のステップを説明する。

サンドイッチング抗体は、水相中で、不溶性支持体に加える。その溶液は、反応物を保護し結合反応を容易にする適切な塩類と緩衝剤類を含有している方が好ましい。例えば該溶液は、ウシ血清アルブミン(BSA)リン酸緩衝液(PBS)、および上記のリン酸溶液中に用いたポリオキシエチレンソルビタンエステルのような親和な界面活性剤を含有していてもよい。インキュベーションは、サンドイッチング抗体が、存在している場合に不溶性支持体に付着している胎児制限抗原の露出エピトープと結合するのに十分な時間続ける。好ましいインキュベーションの時間と温度は、不溶化試薬の抗(胎児制限抗原)抗体と、試験試料の胎児制限抗原との結合について述べたのと同じである。

サンドイッチング抗体の溶液は不溶性支持体から任意に除去してもよく、その支持体は前記のようなリン酸溶液ですすいで、残留している未結合の標識付物質を除去する。

サンドイッチング抗体が標識なしの場合は、サンドイッチング抗体と選択的に結合する、酵素で標識を付けた抗体などの結合試薬を、水相中で不溶性支持体に加える。その溶液には反応物を保護し結合反応を容易にする適切な塩類と緩衝剤類を含有している方が好ましい。例えば該溶液は、ウシ血清アルブミン(BSA)、リン酸緩衝液(PBS)、および前記のリン酸溶液中に用いたポリオキシエチレンソルビタンエステルのような親和な界面活性剤を含有していてもよい。インキュベーションは、標識を付けた抗(サンドイッチング抗体)抗体が、存在している場合に不溶性支持体に付着しているサンドイッチング抗体のエピトープと結合できる十分な時間続ける。好ましいインキュベーションの時間と温度は、不溶化試薬の抗(胎児制限

抗原)抗体と、試験試料の胎児制限抗原との結合について先に述べたのと同じである。

次に標識を付けた抗体の溶液を不溶性支持体から除去し、次いでその支持体を先に述べたようなリン酸溶液ですすいで、残留している未結合の標識付物質を除去する。

本発明のノンブランサンドイッチ法の次のステップでは、不溶性支持体を、酵素の存在下で反応を受ける基質の水溶液と接触させて、溶液中に重光原性化合物もしくは色原性化合物を放出させる。適切な基質および基質を変換させることができる酵素ならびに追加の成分と緩衝剤は先に述べたとおりである。

基質の溶液は、発光原もしくは発色原を生成する反応を起こすのに十分な時間、不溶性支持体とともにインキュベートされる。18~40℃の温度下で、1~20分間のインキュベーション時間を使用できる。好ましくは温度は20~25℃の範囲内で、インキュベーション時間は2~5分間である。ノンブラン上の重光原体と色原体のレベルは反射率計または濃度計を用いて測定することができる。

別のノンブラン法の実施態様では、抗(胎児制限抗原)抗体をノンブランと結合させる。試料と、標識を付けた抗(胎児制限抗原クラス)抗体とを混合する。抗体が結合するのに十分な時間が経過してから、試料/複合体の溶液を上記ノンブランと接触させる。試料中の胎児制限抗原は抗(胎児制限抗原)抗体と結合して、ノンブラン上に抗(胎児制限抗原)抗体/胎児制限抗原/標識付抗(胎児制限抗原クラス)抗体のサンドイッチを生成する。好ましい実施態様では、標識はコロイド金である。

競争免疫検査法: 標識をつけた試薬の胎児制限抗原を用いる本発明の検査法の実施態様は、試験試料と、標識を付けた試薬の胎児制限抗原との混合物を、不溶性支持体に付着させた抗(胎児制限抗原)

抗体と接触させ、次いで不溶性支持体と結合するかまたは溶液相中に残る標識の量を測定することからなる方法である。

標識を付けた抗(胎児制限抗原)抗体を用いる本発明の競争法の実施態様には1種以上の形態がある。不溶性支持体に結合させた抗(胎児制限抗原)抗体を用いる1つの実施態様は、試験試料と、標識を付けた抗(胎児制限抗原)抗体との混合物を、不溶性支持体に付着させた抗(胎児制限抗原)抗体と接触させ、次いで不溶性支持体と結合するか、または溶液相中に残る標識の量を測定することからなる方法である。不溶性支持体に結合させた試薬の胎児制限抗原を用いる他の実施態様は、試験試料と、標識を付けた抗(胎児制限抗原)抗体との混合物を、不溶性支持体に付着させた胎児制限抗原と接触させ、次いで不溶性支持体と結合するか、または溶液相中に残る標識の量を測定することからなる方法である。

これらの各方法では、試験試料を緩衝液で希釈し、インキュベートし、次いで標識を、サンドイッチ免疫検査法の実施態様について先に述べたのと同様にして測定する。初期試薬の濃度は、試験間で結合結合を行うことができるように選択され、不溶性支持体上または溶液中に残留する標識の量は、試験試料中の被検体の量の関数の尺度である。これらの方法は一般に公知であり、その方法を変更して手順を最適化する方法は、免疫検査法の技術分野の当業者には充分に知られている。

また抗(胎児制限抗原)抗体と、試験試料中の胎児制限抗原との結合は、抗(胎児制限抗原)抗体が試料中の胎児制限抗原によって付着している粒子の濃度、抗体抗原反応による抗体の沈澱、または抗原と抗体が結合する際に起こる物理的または電気的変化を導電体ブリッジプローブを用いて行う観察の結果、米国特許第4,647,644号に記載されているような光妨害パターンなどによって測定するこ

とができる。

本発明の適用範囲内に含まれている、試験試料中の胎児制限抗原を測定するのに用いる胎児制限抗原試験キットには、一般に、不溶性支持体に付着させた抗(胎児制限抗原)抗体および抗(胎児制限抗原クラス)抗体が入っている。好ましい実施態様では、抗(胎児制限抗原)抗体はモノクローナル抗体であり、および抗(胎児制限抗原クラス)抗体はポリクローナル抗体である。さらに好ましくは、抗(胎児制限抗原クラス)抗体は酵素で好ましくはアルカリホスファターゼで標識を付けられている。本発明のキットには、さらに、酵素基質、阻性の対照、陽性の対照、リン酸緩衝剤、または試料の適用用具のような1つ以上の試料調製用具が入っている。

本発明のキットには、さらに、試験試料中の胎児制限抗原を測定するために下記のものを含めて入れてもよい。すなわち、試料の移動、貯蔵および希釈に用いる緩衝剤; バイアルビン、ホイル容器などの本発明の試薬の容器; 計測のバイアルビンなどの容器に入った酵素基質の試薬のような他の任意の試薬; 抗体と抗原の結合の存在と程度を測定するための機械的もしくは光学的手段; およびこれらを組合わせたものである。サンプリング用スワブのようなサンプリング用具および移動用と貯蔵用の緩衝剤も入れてもよく、または別個に包装されていてよい。キットの個々の部材はバイアルビン、ホイル容器などの容器のような便利な形態のものに入れられてもよい。例えばホイル容器中の不溶性支持体標識物は、バイアルビンなどの容器に入った他の試薬と組合わすことができる。キットの液体試薬の量も好ましい容器は、適切な量例えば50μlもしくは100μlの液滴を正確に放出するポリエチレン製ドロップボットル容器である。好ましいキットについては実施例で詳細に述べる。

胎児特異抗原による妊娠検査

妊娠診断の具体的な内容は、胎児または胎盤に焦点を当てた独特な成分である胎児特異抗原の検出により構成されており、試験試料は子宮頸管または子宮頸管口の近くより採取する。本発明者は、これらの成分が妊娠後20週の間にこれらの試料中に存在することを発見した。一方母体血液中には、胎児特異抗原の有意な量は存在していないので、試験試料中の母体血液の存在は本発明の試験方法を妨げない。

試験は上述のように行われ、試験試料中に胎児特異抗原の存在を示す結果が得られた場合は妊娠を意味する。

子宮外妊娠の診断

子宮外妊娠を診断する本発明の方法は、子宮頸管または子宮頸管口の近くで採取した試験試料中の胎児特異抗原の、存在の有無検出により構成されている。これら成分の検出可能な量は、正常妊娠の20週の間に採取されるこれらの試験試料中に正常に存在する。妊娠20週の間の妊娠より採取したこれら試験試料中に胎児特異抗原が存在しない場合は、子宮外妊娠のあることを意味する。胎児特異抗原は母体血液中に有意な量存在しないので、試験試料中に母体血液が存在することは、本試験法を妨害しない。

試験試料は子宮頸管と子宮頸管口の両者又は頸管口近くで採取され、その試料は上述のように、試料中の胎児特異抗原の存在、またはその量を確定するため試験される。一方、血清または尿中の妊娠表示ホルモンの存在性検定により妊娠を判定することが望まれるかも知れない。これに関連して広範囲の方法が、試験対象女性の血液または尿を用いて妊娠を診断する分野の熟達者に知られている。信用できる方法はいずれも使用可能である。例えば、血清、血清、な

らびに尿中、または単独に尿中のhCGを測定する方法の特許としては、U. S. Patents に、3,171,783, 3,234,096, 3,236,732, 3,298,787, 3,309,275, 3,485,751, 3,655,838, 3,689,633, 3,862,302, 3,873,682, 3,783,693, 3,833,304, 3,991,175, 4,003,988, 4,014,653, 4,016,250, 4,033,723, 4,071,314, 4,094,963, 4,123,224, 4,123,509, 4,138,214, 4,208,187, 4,210,723, 4,234,561, 4,256,629, 4,268,435, 4,270,923, 4,310,455, 4,313,871, 4,320,111, 4,348,207, 4,371,515, 4,419,453, 4,421,896, 4,493,793, 4,508,829, そして4,665,034がある。その他の妊娠検査法としては、次記のものがある。即ち、尿中 (U. S. Patent 3,141,740) または人乳、血清、または血漿中 (Hungary Patent No. 137028, WPI No. 86-023344/04) のプロゲステロン代謝物の測定; 血清または血漿中 (U. S. Patents 3,892,811, 4,371,515, ならびに4,493,793) のヒトの胎盤のラクトゲンの測定; 尿中のエストロゲンステロイド類の測定 (U. S. Patent 3,955,928); 血清、血漿または尿中 (U. S. Patents 4,016,250, 4,094,963, ならびに、4,320,111) の黄体化ホルモン (LH)、プロラクチン (PRL)、そしてまたはhCG 検出物の測定; 妊娠特有の α_2 -糖蛋白 (U. S. Patents 4,065,445 ならびに4,191,633) の測定; LHの測定 (U. S. Patents 4,138,214 ならびに4,208,187); ウシの血清または尿中のウシの妊娠抗原の測定 (European Patent 出願 189,551, WPI No. 86-042108/06); 新規な胎盤蛋白質の測定 (U. S. Patent 4,592,863) ならびに、早期妊娠因子 VO 8605498 の測定 (WPI No. 86-264940/40) などによる妊娠の診断法があげられる。さらに、その他の妊娠を診断する方法としては、尿に染料を添加する方法 (U. S. Patent 2,587,221 ならびに3,226,196) のジニトロフェニルヒドラジン添加法; U. S. Patent 3,595,620, プロモクレ

ゾール・パーブルまたはクロロフェノール・レッド添加法)、フォー Y 試験紙法 (U. S. Patent 3,248,173)、他の化学剤添加法 (U. S. Patent 3,278,270)、酸と食塩の混合物で女性の血液を処理する方法 (U. S. Patent 3,883,304) があげられる。妊娠は、U. S. 出願 No. 121,902 (filed: November 17, 1987) の特許の方法にしたがい、子宮頸管または子宮頸管口の近くで採取した試験試料を用いる検査法も可能性がある。上述の方法はいずれも使用可能であるが、hCG を測定するような方法が望ましい。

妊娠後20週の間の試験試料で、胎児特異性抗原が陽性結果を示しているのに妊娠していないとの結果がある際は、子宮での正常な妊娠でなく、子宮外妊娠が起きていることを示している。

受精卵に伴う生成成分の生体外 (ex vivo) 試験

受精卵に伴い生成する成分を生体外で試験する本発明の内容は、検出される自然抗原により生成、または子宮内腔手術または治療的流産処理を行っている際に、排出される試料についての胎児特異性抗原の検出により構成される。胎児特異性抗原は母体の血液中には有意な量は存在しないので、試験試料中に母体の血液が存在することで、本試験方法は妨害されない。

受精卵に伴い生成する成分の生体外での存在を検査する試験試料は、子宮から排出される成分を代表すると考えられているものを入手することができる。この様な試料は、治療的流産または子宮内腔手術手術中に排出される生体組織である。

或いは、その試験試料は、自然抗原または抗原の濃度と考えられている腫瘍細胞であることでもある。試験試料は一般に液体と胎児細胞の両者から構成されている。また試料は、生体組織、腫瘍または子宮頸管粘液、他の腫瘍または子宮頸管分泌物、細胞または

細胞断片、羊水、胎児または母体の他の成分などを含有している。一方この試料は腫瘍から、グクロンや他の細胞状の先端を備えた綿棒、アスピレーター、吸引装置、洗浄装置、その他の類似物などを用いて採取することが出来る。またこの試料は、子宮内腔手術術、治療的流産手術中に排出される生体組織を代表しており、懸念される自然抗原の場合には、女性の保護用のめて物を用いて手に入れることもできる。試験試料は上述のように、感受性の高い蛋白系被膜物を保護する液体中に懸濁していることが重要な点である。

胎児特異性抗原の検出は上述の方法により行うことができる。妊娠の診断にあたっては、血清または尿中の妊娠表示ホルモンの有無検査を添加して行うことが望まれる。子宮外妊娠に関連して前述したような方法も含め、信頼できる方法は、いずれも使用可能である。

子宮内腔手術術、治療的流産、懸念される自然抗原 (流産) の取られる試験試料は、胎児特異性抗原の有無の検査用に使用することができる。妊娠の存在があり、治療的または自然流産を代表していることが期待される試験試料中の胎児特異性抗原の結果が陽性になることが同時に起きた場合は、妊娠があった徴候で、検査は継続する。妊娠の存在があり、治療的または自然流産を代表することが期待されている試験試料中の胎児特異性抗原の結果が陽性になった場合は妊娠があった徴候で、この場合は検査は打切る。妊娠インディケーターならびに、子宮内腔手術手術中に得た試験試料中の胎児特異性抗原の結果の両者が不存在的の結果となった場合は、妊娠には違っていないという結果で、また妊娠も続いていなかったということである。

早期の危険/環境試験

早期の危険増大を示すための本特許の内容は、妊娠20週後の試験

試料中の胎児特異性抗原の検出を含めている。本発明者らは、これら成分の検出可能な量は、妊娠20週後の後腹膜、子宮頸管、子宮頸管口の付近から得たもの等の試料には一般に存在しない。妊娠20週後に採取した試料中に、これら成分の検出可能な量が存在することは、切迫早産の危険増大を示すと共に、または早産徴候の徴候を示している。胎児特異性抗原は母体血液中には有意な量は存在しないので、試験試料中の母体血液の存在は本試験法を妨害しない。

試験試料は、後腹膜、子宮頸管、子宮頸管口の付近から採取され、該試料は前述の様に試料中の胎児特異性抗原の存在、または量を検査するべく試験される。妊娠20週後の試験試料中に胎児特異性抗原の存在を示す結果が得られた場合は、早産徴候の可能性と、または早産の危険増大の徴候である。

不溶性担体

本発明における抗原および抗体試薬は従来の通常プロセスで不溶性担体膜に結合させることができる。例えば、US PATENT, 3,234,096, 3,236,732, 3,309,275, 3,873,683, 3,951,175, 4,003,988, 4,016,250, 4,033,723, 4,071,314, 4,348,207, 4,419,453 に記載されたような不溶性担体への抗原類の結合用および、ラテックス粒子および赤血球に対する抗原の結合用に通した抗原結合法が利用できる。不溶性担体に対する抗体の結合法は、例えば、US PATENT 3,551,555, 3,553,310, 4,048,298 および RE-29,474, さらに Tijssen 著 "PRACTICE AND THEORY OF ENZYME IMMUNO-ASSAYS", Elsevier Science Publishers, (1985) pp 297-326 に述べられている。吸着によるポリスチレンに対する抗体の結合操作は、例えば、US PATENT 3,646,346 および 4,092,408 に述べられている。本発明の明確化および制限範囲を越えないことを目的として、抗体の不溶

本発明における好ましい不溶性担体はナイロンおよびニトロセルロース系膜から成る材料である。これに次ぐ不溶性担体はスチレン、スチレン-アクリルニトリル共重合体のようなスチレン共重合体またはポリエチレンまたはポリプロピレンのようなポリオレフィン類およびアクリル酸およびメタアクリル酸重合体とその類似体から製造される材料である。本発明における最も好ましい不溶性担体はナイロン膜またはポリスチレンマイクロホールプレートである。抗体試薬または抗原試薬は吸着、イオン反応、ファン・デル・ワールス吸着、静電気的または他の非共有結合的に不溶性担体に結合でき、あるいは共有結合によっても不溶性担体に結合可能である。

この処理において特に有利な担体は微孔の凹部を有するマイクロホールプレートの構成体である。凹部の表面またはプラスチックカップはその中に抗原または抗体を保持する構造となり得る。定量が重光測定を用いる必要があれば、マイクロホールプレートまたは凹部への添加によって、好都合にも、先に対して、ある凹部に対して加えられた励起光が周辺の凹部の内部にまで到達または影響を及ぼさない程度に不透明となる。

非共有結合を利用する操作が US PATENT 4,528,267 に記載されている。抗体と抗原が不溶性担体と共有結合を行う操作を I. Ciliberto が IMMOBILIZED ENZYMES, Intated Press: New York (1978) に、および A. Centocorno が J. Biol. Chem. 245: 3059 (1970) に述べている。表面を蛋白で被覆し、例えばカップリング試薬としてグルタルアルデヒドを利用する US PATENT 4,210,418 に述べた操作を用いて、抗体または抗原と連結させることができる。

これに替わる処理として、凹部をポリエーテルインシアネートのような遊離イソシアネート基を有する物質層で被覆し、そこへ水溶液中の抗体または抗原が与えられ、集約的に結合させることができ

性担体膜への結合に因する操作を以下に述べる。これらの操作は抗体試薬、例えば、抗-（胎児特異性抗原）抗体類のような、および抗-（胎児特異性抗原）抗体、さらに、胎児特異性抗原のような抗原試薬の不溶性担体膜への結合に適している。

抗体の不溶性担体表面への結合および抗原の結合反応に対する妨害のないことまたはその結合反応の存在およびその規模を決定するために利用できる副反応を優先的に考慮して、種々の材料を不溶性担体として利用できる。天然および合成両者の有機および無機性の重合体も不溶性担体として利用できる。適当とされる重合体の例の中には以下の材料が含まれる：ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリブチレン、ポリ（メチルブチレン）、ブチルゴム、塩素化重合体、ポリエステル類、ポリアミド類、セルロースおよびその誘導体（酢酸繊維素、ニトロセルロースおよびその類似体等）、アクリル酸エステル類、メタアクリル酸エステル類、ビニル樹脂（ポリビニル酢酸、ポリ塩化ビニル、ポリビニルピクリンクロライド、ポリビニルフルオライド等）、ポリスチレン、スチレングラフト共重合体類、レイコン、ナイロン、ポリビニルアルコール、ポリフェルムアルデヒドなど。不溶性担体として利用できるその他の材料としては上記重合体のラテックス類、シリカゲル、シリコンウエハー、ガラス、紙、不溶性蛋白、金属膜、半金属膜、金属酸化物、絶縁材料、半導体材料、セルノットおよび類似体を挙げることができる。さらに、蛋白質、ゼラチン類、リボ多糖類、核酸塩類、アガロース、ポリアクリルアミド類のようなゲル形成物質、または数層の水相相を形成するデキストラン類、ポリアルキレングリコール類（2-3の炭素原子を有するアルキレン基）または界面活性剤、例えばキスフォリビッドのような親水親油両性物質、長径（12-24の炭素原子を有するアルキルアンモニウム塩類および類似体）も含まれる。

さらに別の処理では、US PATENT 3,720,760 に記載されているように、ブロムシアン性によって抗体または抗原を水酸化された材料に連結させることもできる。

非特異的結合を防ぐために不溶性担体を「ブロック」することが好ましい。適当な阻害剤の選択は不溶性担体のタイプによって定まる。例えば、ポリスチレン系担体膜に通ずる阻害剤は水溶性非免疫性の動物蛋白を含む。水溶性非免疫性の動物蛋白として牛血清アルブミン（BSA）；ヒト、ウサギ、ヒツジ、およびウマ血清アルブミン；カゼインおよび豚肝ミルク；卵白アルブミン；卵蛋白；およびこれらの類似体が含まれる。最も好ましい阻害剤/安定剤濃度は4%BSA、1%マンニトール、0.5%カゼイン、0.01% BSAである。

同様な阻害剤をナイロンおよびニトロセルロース担体膜に対して使用できる。しかし、ニトロセルロースおよびナイロン膜状担体膜に対して好ましい阻害剤は豚肝ミルクまたはカゼインである。これらの膜状担体に最適な阻害剤は1ないし5重量%の豚肝乾燥粉乳またはカゼインおよびポリオキシエチレンソルビタン誘導体およびポリオキシエチレンエーテル類のような非イオン界面活性剤である。

標識化試薬

本発明における胎児特異性抗原標識化試薬、抗-（胎児特異性抗原）抗体、抗-（胎児特異性抗原）抗体および抗-（タンドウウィッチ抗体）試薬抗体類は、蛋白に対する従来の放射標識化操作により、好ましくは抗体結合位置に適宜な保護基を導入して、調製できる。

化学的または物理的な結合により蛋白試薬は標識に結合または連結することができる。本発明の抗原または抗体類が共有結合で結合するリガンドおよび原子団または配位子には、その試薬が試験試料中で

化合物および材料から識別用に利用できる元素、化合物または生体材料が含まれる。

本発明の放射性同位元素による抗体の標識化は、以下に説明される操作を述べる。またここに述べる操作は、この抗体抗原複合体または胎児特異抗原のようなあらゆる蛋白質化合物または蛋白質物質に対しても一般に適用できるものである。

表 A			
同位元素	純同位元素の比放射能 (キューリー/モル)	半減期	
^{14}C	6.25×10^4	5720 年	
^3H	2.91×10^4	12.5 年	
^{35}S	1.50×10^4	87 日	
^{125}I	2.18×10^4	60 日	
^{32}P	3.16×10^4	14.3 日	
^{131}I	1.62×10^4	8.1 日	

本発明の放射性同位元素による抗体の標識化は *in vitro* の試験にも利用できる。標識される抗体の比放射能は半減期、放射性同位元素の同位元素の純度、および標識部位がその抗原または抗体に取り込まれる程度に基づいて決められる。表 A に数種の汎用同位元素とその比放射能および半減期を例示した。一般に、インミュノアッセイにおいては比放射能が高い程度でも改善される。

表 A に記載した放射性同位元素による抗体の標識化は一般に熟知されている操作である。例えば、トリチウム標識は US Patent 4,302,436 に記載されている。抗体に対し特に採用される要素化、

トリチウム標識化および ^{35}S 標識化について Golding が J. IMMUNOLOGICAL ANTIBODIES: PRINCIPLE AND PRACTICE, New York: Academic Press (1983) pp 124-126 に述べ、また参考文献もその中に引用されている。抗体の要素化のその他の操作は Hunter および Greenwood が, Nature 144: 945 (1962) に、David らが Biochem J 101: 1014-1021 (1974) にのべている。また US PATENT 3,867,517 および 4,376,110 にも記載されている。適切なシステム、標識操作の例およびそれに付随する装置の反応は、例えば、US PATENT RE-31,006, 3,654,090, 4,214,048, 4,289,747, 4,302,438, 4,312,943, 4,376,110 に開示され、その中に参考文献も引用されている。その他の適切なシステム例は Pesce らが Clin. Chem. 22: 353-359 (1974) に、Widom, E. が Clin. Chem. 22: 1243 (1976) に述べている。

適切な標識化に利用できる酵素類および各種類の特異的な例を以下に示す：

種 類	酵 素 例
ヒドロラーゼ	アミラーゼ
スクレアーゼ	ポリスクレオチダーゼ
アミダーゼ	アルギナーゼ
プリン デアミナーゼ	アデナーゼ
ペプチダーゼ	アミノポリペプチダーゼ
プロテイナーゼ	ペプシン
エストラゼ	リパーゼ
核酵素	カタラーゼ
阻害剤	チロシナーゼ
補酵素含有酵素	アルコール デヒドロゲナーゼ
シクロオキシゲナーゼ	コハク酸
デヒドロゲナーゼ	
黄色酵素	ジアホラーゼ
ムターゼ	グリコサラーゼ
デスモラーゼ	アルドラーゼ
オキシダーゼ	グルコース オキシダーゼ
ペルオキシダーゼ	ホースラディシ
ホスファターゼ	アルカリ ホスファターゼ
	酸性ホスファターゼ
デヒドロゲナーゼ	GGPDB (グルコース 6- ホスホデヒドロゲナーゼ)
	β-ガラクトシダーゼ
ホスホリラーゼ	
ホスホキナーゼ	

適切な酵素は、Bark at al, PRACTICAL PHYSIOLOGICAL CHEMISTRY, New York: McGraw-Hill pp. 306-397 (1954) に記載されている。

蛍光特性および色原体性酵素（選択された基質が蛍光又は色原体生成物を生成するであろうものの存在下での酵素）は、有用なラベリング成分である。抗原と結合する抗体の能力を弱めずに抗体に酵素を選択的に接合し、そしてタンパク質性試薬に酵素を接合するための方法は当業界において良く知られている。

適切な酵素及び抗体にそれらを結合するための方法は、I. Chibata, Immobilized Enzymes, Reinhold Press: New York (1978); A. Costacasan, J. Bio. Chem. 245: 3059 (1970); Wilson, H. など, International Conference in Immunofluorescence and Related Staining Techniques, W. Knapp など, 編纂者, Amsterdam: Elsevier pp. 215-244 (1978); Sullivan, H. など, Ann. Clin. Biochem. 16: 221-240 (1979); Hygren, H. など, Red. Biol. 57: 187-191 (1979); Gadhari, D. など, J. Virol. Meth. 10: 215-224 (1985); Jijssens, P. など, Anal. Biochem. 136: 451-457 (1984); Tancula, J. など, J. Biochem. Cytol. 33: 767-777 (1985); Ishikawa, E., J. Immunossay 4: 209-327 (1983); 及びアメリカ特許第 4,190,496 号により記載される。

好ましい酵素及びそれに対応する適切な基質は、ホースラディシペルオキシダーゼ及びこのための適切な基質である o-フェニレンジアミン、m-フェニレンジアミン、o-ジアニジン、及び 4-クロロ-オ-ナフトールである。それらはまた、β-ガラクトシダーゼ及びそれに対応する適切な基質である 4-メチルウンベリフルル-β-D-ガラクトシド、p-ニトロフェニル-β-D-ガラクトース、p-ニトロフェノール、o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトース及び o-ニトロフェノールを含む。それらは、

アルカリホスファターゼ及びそれに対応する適切な基質である

-ニトロフェニルホスフェート、インドキシルホスフェート及び5-ブromo-3-クロロインドキシルホスフェートを包含する。従って最も好ましい酵素基質の組合せは、アルカリホスファターゼ及びフェノールフタレインモノホスフェートである。

抗体を酵素ラベリングするための適切な方法の例は、カルボジイミド、ジアルヒド及び二官能基カップリング試薬の使用を包含する。アミド基を有する酵素の結合は、無水溶媒、たとえばジメチルホルムアミド、ジオキサン、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン又は同様のものにおいて、塩化チオニル、N-ヒドロキシスクシンイミド又は類似する試薬によりタンパク質を処理することによって達成される。他のカップリング剤は、カルボジイミド、たとえば1-エチル-3-(3-(N,N'-ジメチルアミノ)プロピル)-カルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド、N-エチル-3-(3-トリブチルホスホネート)スクシンイミド、4-(N-メレイドエチル)-シクロヘキサ-1-カルボキシレート及びスクシンイミド-3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオネートを包含する。

酵素の脱水化合物成分はまた、アルデヒドに酸化され、そして免疫グロブリンのリシルアミノ基と反応され、シッフ塩基が形成される。明水溶性ナトリウムによる還元は、酵素及び抗体の適切な結合をもたらす。キースラディシムペルオキシダーゼ及び抗体は、Wiles, S. 等, International Conference in Immunofluorescence and Related Staining Techniques, W. Knapp 等, 編纂者, Amsterdam: Elsevier pp 215 ~ 244 の方法により、免疫グロブリンに効果的に結合される。

蛍光団及び発色団によりラベルされた抗体は、当業界において知

られている標準の蛍光成分から調製される。抗体及び他のタンパク質は、約310 mμまでの波長を有する光を吸収するので、蛍光成分は、約310 mμ及び好ましくは約400 mμの波長で実質的な吸収性を有するように選択されるべきである。

種々の適切な蛍光体及び発色体は、Stryer, Science 162 : 526 (1968) 及び Brand, L. 等, Ann. Rev. Biochem. 41 : 843 ~ 868 (1972) により記載される。抗体は、従来の方法、たとえばアメリカ特許第3,940,475号、第4,289,747号及び第4,375,110号に開示される方法により蛍光発光団グループによりラベルされる。

上記の所望する多くの性質を有する蛍光体の1つのグループは、キサンテン色素であり、これは3, 6-ジヒドロキシ-9-フェニルキサンチンチオール及びレサミンに由来するフルオレセイン及び3, 6-ジアミノ-9-フェニルキサンチンチオール及びリサニウムロダミンBに由来するロダミンを包含する。9-オ-カルボキシフェニルキサンチンチオールのロダミン及びフルオレセイン誘導体は、9-オ-カルボキシフェニル基を有する。反応性カップリング基、たとえばアミノ及びイソチオシアネート基を有するフルオレセイン化合物、たとえばフルオレセインイソチオシアネート及びフルオレセインは容易に入手できる。

蛍光化合物のもう1つのグループは、α又はβ位置にアミノ基を有するナフタルアミンである。ナフタルアミン化合物の中には、1-ジメチルアミノナフタル-5-スルホネート、1-アニリノ-8-ナフタレンスルホネート及び2-ピトリジン-6-ナフタレンスルホネートが包含される。他の色素は、3-フェニル-7-イソシアネートクマリン; アクリジン、たとえば9-イソチオシアネートアクリジン及びアクリジンオレンジ; N-(p-(2-ベンゾキザゾリル)フェニル)マレイミド; ベンゾキザゾール、た

たとえば4-クロロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1, 3-ジアゾール及び7-(p-メトキシベンジルアミノ)-4-ニトロベンゾ-2-オキサ-1, 3-ジアゾール; ステルベン、たとえば4-ジメチルアミノ-4'-イソチオシアネート-ステルベン及び4-ジメチルアミノ-4'-マレイミドステルベン; N, N'-ジオクタデシルオキサカルボキシアミン-p-トリブチルホスホネート; ビレン、たとえば8-ヒドロキシ-1, 3, 6-ビレントリスルホン酸、1-ビレン酸、メロシアン540、ローズベンガル、2, 4-ジフェニル-3 (2H)-フナノン、o-フタルデヒド、及び他の容易に入手できる蛍光成分を包含する。それらの色素は、蒸気官能基を有し、又はそのような官能基は容易に導入される。

抗体は、Goding, J., Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, New York: Academic Press (1983) pp 208 ~ 249 により記載される方法によりフルオロクロム又は発光団によりラベルされる。フルオロクロムの濃度は、Goding, 前記, p229の表に従って選択される。たとえば、BHSOにおけるフルオレセインイソシアネート (1.0 mg/ml) 又はロダミンイソシアネート (10.0 mg/ml) が調製され、そして所望する体積 (合計のタンパク質溶液体積の1 ~ 10%) が、攪拌されながら、タンパク質溶液に滴下される。反応は2時間進行し、光から遮断される。生成物は、0.1%のNaOHを含むPBS中、SEPHADEX 6-25ゲル上でのゲル濾過により精製され、本反応又は加水分解されたフルオロクロムが分離される。複合体の吸光度は280 mμ及び可視領域におけるそのピーク (フルオレセイン化された抗体のために495 mμ及びロダミン化された抗体のために550 mμ) で測定される。フルオロクロム: タンパク質の比は、Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, New York: Academic Press (1983) pp 224 ~ 225 の方法に従って計算される。

複合体は、使用まで保護するために4℃で貯蔵される。抗体溶液濃度が1 mg/ml以下である場合、BSAが、1 mg/mlの最終濃度まで溶液に添加される。

本発明のアクセシに使用される抗体及び試薬抗体は、アビジン又はビオチンに共有結合される。適切な結合方法は、二官能基カップリング試薬を有する抗体を包含する。適切な二官能基化合物は、Peterson, E. 等, Ann. Rev. Biochem. 48 : 523 (1977) により記載される。アルキルイミドは、タンパク質によりそれらに示される官能基の間で高い程度の特異性を示す。その反応は一次アミノ基に対して特異的である。適切なカップリング試薬の例は、アミドエステル、たとえばジメチルマロンイミド、アジド、たとえばアミド結合を生成するためにイミノ基と容易に反応するタルトリルジアジドのアシルアジドを包含する。アシルトリルジアジド (たとえば1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン、又は4, 4'-ジフルオロ-3, 3'-ジニトロフェニルスルホン、グルタルアルデヒド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、ジマレイミド、混合された無水物、m-マレイミドベンゾイル、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、及び他の既知の試薬) が使用される。

前述の試薬は、実質的に不可逆的な結合を提供する。官能基を有する二官能試薬、たとえばジスルフィド又はグリコールが使用される。それらは、所望により、空阻反応の後、分離される結合を提供する。そのような試薬は、ジメチル3, 3'-ジチオビスプロピオンイミド、スクシンイミドプロピオンイミド、N-(3-フルオロ-4, 6-ジニトロフェニル)-シスチニン、タルトリルジアジド、タルトリルジ (グリシルアジド) 及びタルトリルジ (エプシロン-アミノカプロイルアジド) を包含する。

他の場合、結合は、試薬自体の間で直接的に形成され得る。たとえば、該体は、それぞれの材料上での官能基を通してビオチンに結合され得る。特定の例として、ビオチンは通常、常態塩により処理され、そしてアビジン結合へのビオチンを阻害しないで又は該体の免疫学的活性をブロックしないで、シッフ基形成を付与するために抗体と反応せしめられ得る。アビジン-接合された及びビオチニル化された試薬は、Vector Laboratories, Burlingame, California から入手できる。

二官能価架橋剤を用いての既知の法は、次のものを包含する：

(a) 1段階グルタルアルデヒド結合、Avramova, S., *Immunoch.* 6: 43 (1969); (b) 2段階グルタルアルデヒド結合、Avramova, S., *Immunoch.* 8: 1175 (1971); 及び(c) ジマレイノド結合、Halo, K. など, *Eur. J. Biochem.* 62: 285 (1966)。

抗体は、Hastowich, D. など, J. Appl. Rad., 35: 554 ~ 557 (1984) 及び Buckley, B. など, Fed. Eur. Biochem. Soc., 166: 202 ~ 204 (Jan., 1984) の方法に従って、金属放射性核種によりラベルされる。この方法においては、抗体はキレート剤、たとえば金属放射性核種とキレートを形成できるジエタレントリウムペンタ酢酸塩 (DTPA) により結合される。DTPA の二価式両水物の 0.1 mg/ml の懸濁液は、無水溶媒、たとえばクロロホルム、エーテル又は無水DMFO において調製される。アリコートが、1:1 のモル比の DTPA: 免疫グロブリンを提供するのに十分な、きれいで乾燥した管に移され、そして室温下で混発される。塩溶液における 0.05 M の炭酸水素塩緩液 ($\text{pH } 7.0 \sim 7.5$) 中、使用される抗体濃度 ($10 \sim 20 \text{ mg/ml}$) の $10 \sim 20 \text{ ml}$ 部分が、無水 DTPA に添加され、そしてその内容物が $0.5 \sim 1.0$ 分間、攪拌される。結合されたタンパク質調製物を同じ緩衝溶液により 0.2 ml に希釈され、そして塩析液で調製を用いて、SEPHADEX G-50

る。

カラムを2~3体積の緩衝液(0.01MのPBS, pH7.2)により平衡化し、そして抗-胎児フィブロネクチン抗体含有増液を次にカラムに適用する。増液の吸光度を、タンパク質がカラムからもはや通過しなくなるまで、280 nmでモニターする。次に、カラムを0.1Mのグリシン緩衝液(pH2.5)により洗浄し、イムノアフィニティー結合された抗-胎児フィブロネクチン抗体を脱着する。ピーク成分を蒸め、アルコール、そして無菌用の緩衝液の交換を伴って、0.01MのPBS(pH7.2)に対して4℃で24~36時間、透析する。

より高い純度が希望される場合、アフィニティー精製された IgG を、上記方法により成人の血清フィブロネクチン結合アフィニティーカラムに通し、成人の血清フィブロネクチンと交差するいくつかの抗体を除去する。

实施例 2

モノクローナル抗-（胎児フィブロネクチン）抗体

実施例1の方位により得られた陽性胎児フィブロネクチンを用いて、胎児フィブロネクチンに対するマウスモノクローナル抗体を、Goffin and Hilslein, *North. J. Zool.* 73: 1 (1981) 及び Nakagawa, H. and Nakamori, S. など, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6517 ~ 6521 (1985) の陽性方法を用い、そしてマウスの免疫化のための抗原として胎児フィブロネクチンを用いて得る。モノクローナル抗体を、文献、たとえばLongo など, *Cell. Exp. Immunol.* 25: 191 (1976) 及び Pisantyski など, *J. Immun. Meth.* 41: 187 (1981) に記載される技法の更佳を用いてスクリーンする。

ファスモノクローナル抗体を、Elisson, Practice and Theory of Enzyme Immunoassay, Elsevier Science Publishers, pp 105 ~ 107 (1985) の方法に従って、Protein-A結合Sephacross-4B (Pharmacia

ゲルによる 5sec ゲル透過カラム上で精製される。結合効率が、0.5 M の酢酸塩緩衝液 (pH 6.0) 中、“キレート化一品種”の ^{111}In の添加により、特異的に決定される。薄層クロマトグラフィーが、結合効率の計算のために DTPA 結合抗体を分離するために使用される。DTPA 結合抗体は、金属放射性核種、たとえば $^{111}\text{In} + 3$ 、 $^{188}\text{Re} + 3$ 及び $^{90}\text{Y} + 3$ と結合するために必要なまで、4℃で貯蔵され得る。

本発明は、次の特定の実施例によりさらに例示されるが、但しそれは非制限的な例である。特にことわらない限り、温度は℃であり、そして%は重量%である。

實施例 1

ポリクローナル抗-（胎児フィブロネクチン）抗体

胎児フィブロブラスチンを、Savall and Ruuslahti, *Int. J. Cancer* 20:1-5 (1977) により記載されているようにして羊水から精製する。

抗一(胎児フィブロネクチン)抗体を、文献、たとえばStellar, *Neub. Enzym.* 70 : 70 (1980)に記載される免疫化技法及びスケジュールを用いてウサギに誘発し、胎児フィブロネクチン抗原によりウサギを免疫化する。其富満、たとえば、Lange など、*Exp. Immunol.* 25 : 191 (1976)及びPinotsky など、*J. Immun. Meth.* 41 : 187 (1981)により記載されるような、モノクローナル抗体のために使用されるアッセイに類似する固相アッセイにおいてスクリーンする。

血清中の IgG 成分を、胎児フィブロネクチンが結合されている CNBr-Sephrose 4B (Pharmacia Fine Chemicals) を用いてアフィニティークロマトグラフィーによりさらに精製する。結合のために使用される方法は、ゲル製造業者、Affinity Chromatography, Pharmacia Fine Chemicals, pp 15-18 により精製される方法である。

Fine Chemicals) を用いて、懸水又はハイブリッド培養上清液から精製する。

实例 3

ポリクローナル抗-（胎児フィブロネクチン）抗体-被覆のマイクロタイタープレート

実施例1に記載されるように成人フィブロネクチン交差反応性を除去するために調製され、そしてさらに精製されたウサギ抗-（胎児フィブロネクチン）を、0.05Mの炭酸緩衝液（pH 9.5）により10 mg/mlに希釈する。その100 μ lを、Immulon II マイクロタイタープレート（Dynaltech）の個々のウェル中に分散する。プレートを包埋し、そして室温で4時間又は4℃で一晩インキュベートする。プレートは洗浄緩衝液（0.02MのトリスHCl、0.015MのNaCl、0.05のTween-20）により、ウェルを満たし、そして空にすることによって4度洗浄する。次に、プレートを、ブロッキング溶液（0.01MのPBS、1%のBSA、0.02%のNaN₃、pH 7.4）200 μ lを個々のウェルに分散し、そして室温で1時間インキュベートすることによってブロックする。次に、ウェルを、上記のようにして洗浄緩衝液により4度洗浄する。プレートは、その時点で、サンプルのイムノアッセイに使用できる。

五、实例 4

ポリクロール塩化ヒトフィブロンクテン誘体

ヒト血盤フィブロネクチンを、Engvall and Huestahl, *Int. J. Cancer* 20 : 1-5 (1977) により記載されるようにしてヒト血盤から精製した。

抗-ヒト血盤フィブロネクチン抗体を、文献、たとえばStoller, Holb. Enzy. 70 : 70 (1985) に記載される免疫化技法及びスケジュールを用いてヤギに誘発し、ヒト血盤フィブロネクチン抗原によ

りやぎを免疫化した。抗血清を、たとえば Lange など、Clin. Exp. Immunol. 25 : 191 (1976) 及び Pisetsky など、J. Immun. Meth. 41 : 187 (1981) により記載されるような、モノクローナル抗体のために使用されるアッセイに類似する固相アッセイにおいてスクリーニングする。

抗血清の IgG 成分を、ヒト胎児フィブロネクチンが結合されている CBr-Sephrose 4B (Pharmacia Fine Chemicals) を用いてアフィニティークロマトグラフィーによりさらに精製する。結合のために使用される方法は、ゲル製造業者、Affinity Chromatography, Pharmacia Fine Chemicals, pp 15 ~ 18 により推薦される方法である。

すぐに、カラムを 2 ~ 3 体積の緩衝液 (0.01 M の PBS, pH 7.2) により平衡化し、そして抗-ヒト胎児フィブロネクチン抗体含有溶液を次にカラムに適用する。抽出液の吸光度を、タンパク質がカラムからもはや通過しなくなるまで、280 nm でモニターする。次に、カラムを、280 nm での基線吸光度が得られるまで、平衡化緩衝液により洗浄する。

イムノアフィニティー結合された抗-ヒト胎児フィブロネクチン抗体を、0.1 M のグリシン緩衝液 (pH 2.5) により洗脱した。ピークタンパク質成分を集め、プールし、そして緩衝液の交換を行って、0.01 M の PBS (pH 7.2) に対して 4 で 24 ~ 36 時間、透析した。

上記方法をくり返し、ヒト胎児フィブロネクチンによりウサギを免疫化し、そして得られたポリクローナル抗-ヒトフィブロネクチン抗体を精製した。

実施例 5

ポリクローナル抗 フィブロネクチン抗体-被覆マイクロタイ

モノクローナル抗体を、次の方法によるイムノアッセイへの使用のために調製した。培養上清液又は懸水の IgG 成分を、硫酸アンモニウム分別により沈降せしめた。抗体を、製造業者の指示に従って、Protein-G Fast Flow (Pharmacia Fine Chemicals) 上でのアフィニティークロマトグラフィーによる精製のために適切な緩衝液中に再溶解し、そして透析した。

実施例 7

モノクローナル抗体-被覆のマイクロタイタープレート
マイクロタイタープレートを、下記方法に従って、FDC-6 モノクローナル抗体により被覆した。

実施例 6 に記載されるようにして調製されたモノクローナル抗体 FDC-6 を、リン酸緩衝液 (pH 7.2) に希釈し、10 μ g/ml にし、そしてウェル当たり 100 μ l をポリスチレンマイクロタイタープレート (Costar) 中に分散した。プレートを室温で 2 時間又は 4 で一晩インキュベートした。ウェルの含有物をアスピレートし、そしてウェルを実施例 5 に記載されるように洗浄緩衝液 (0.02 M のトリス HCl, 0.01 M の NaCl, 0.05 % の Tween-20) により 3 ~ 4 度洗浄した。次に、200 μ g/ml のブロッキング/安定溶液 (4 % のスクロース, 1 % のマンニトール, 0.5 % のカゼイン, 0.01 M の PBS) をウェルに添加し、そして室温で 30 分 ~ 4 時間インキュベートした。次に、ウェルをアスピレート乾燥し、そしてプレートを乾燥バウチにより気密容器にパッケージし、そして必要とされるまで、4 で貯蔵した。

上記方法を、Isac and Dynatech からのマイクロタイタープレートを用いてくり返し、そして同等の結果を付与した。

実施例 8

解凍ラベルされた抗- (フィブロネクチン) 抗体

プレート

実施例 4 に記載されるようにして調製されたヤギ抗-ヒト血清フィブロネクチン、0.05 M の炭酸緩衝液 (pH 9.6) により 10 μ g/ml に希釈する。100 μ l を、たとえば Costar, Nunc, 又は Dynatech により供給されるポリスチレンマイクロタイタープレートの個々のウェル中に分散する。プレートをカバーし、そして室温で 2 ~ 4 時間又は 4 で一晩インキュベートする。プレートを、洗浄緩衝液 (0.02 M のトリス HCl, 0.015 M の NaCl, 0.05 % の Tween-20) により、個々の使用のために満たし、そして完全に空にすることによって 3 ~ 4 度洗浄する。次に、プレートを、200 μ l のブロック/安定溶液 (4 % スクロース, 1 % マンニトール, 0.01 M の PBS, 1 % の BSA, 0.02 % の NaH₂PO₄, pH 7.4) を個々のウェル中に分散することによってブロックし、そして室温で 30 分 ~ 2 時間インキュベートする。次に、ウェルを乾燥し、プレートを乾燥バウチにより気密容器においてパッケージし、そして必要とされるまで 4 で貯蔵する。

実施例 6

ハイブリドーマ 8B9D18 からのモノクローナル抗体

American Type Culture Collection に寄託され、そして受託番号 ATCC 8B9D18 であるハイブリドーマの調製法は、引用により本明細書に述べられる。1990 年 1 月 16 日に公開されたアメリカ特許 4,894,325 号 (Nakamura など) に詳細に記載されている。

前記ハイブリドーマを、10 % ウシ胎児血清により補充された RPMI 1640 細胞培養培地において培養した。さらに、そのハイブリドーマを、Hiebel and Shilgi (Selected Methods in Cellular Immunology, W. B. Freeman & Co. San Francisco, p368, 1980) の方法に従って、ハイブリッド細胞の注入によりマウスにおいて培養した。

FDC-6 と命名され、そして前記ハイブリドーマにより生成された

実施例 4 に従って調製された抗-ヒト胎児フィブロネクチン抗体を、Avrameas, Immunochem. 6 : 43 (1969) の 1 段階グルタルアルデヒド方法に従ってアルカリホスファターゼにより接合した。

実施例 9

胎児フィブロネクチンアッセイキット及び方法

好ましい態様において、胎児胎児抗体、すなわち胎児フィブロネクチンのためのアッセイキットは、次の試薬を含んだ：

1. ネズミモノクローナル抗-胎児フィブロネクチン抗体により被覆されたマイクロタイタープレート、
2. アルカリホスファターゼ接合のアフィニティー精製されたポリクローナルヤギ抗-フィブロネクチン抗体、
3. 酵素基質、
4. 負の対照、
5. 正の対照、
6. すすぎ用緩衝液 (50X)。

ネズミモノクローナル抗-胎児フィブロネクチン抗体により被覆されたマイクロタイタープレート及びアルカリホスファターゼ接合のアフィニティー精製されたポリクローナルヤギ抗-フィブロネクチン抗体を、それぞれ実施例 7 及び 8 に記載されるようにして調製した。マイクロタイタープレートを、乾燥剤を含む密封されたプラスチックバッグにそれぞれ 8 個のウェルの 12 ストリップとしてパッケージした。貯蔵抗体混合物を、混合緩衝液 (0.05 M のトリス緩衝液, pH 7.2, 2 % の D-ソルビトール, 2 % の BSA, 0.1 % のアジ化ナトリウム, 0.01 % の Tween 20, 1 pH の塩化マグネシウム及び 0.1 % の塩化亜鉛) により適切に希釈し、そしてその 10 μ l をポリエチレンドロップボトル容器に入れた。

酵素基質 (ポリエチレンドロップボトル容器において 10 μ l) は、

0.1mMの塩化マグネシウム及び0.2%のアジ化ナトリウムを有する0.4Mのアミノノチルプロパンジオール緩衝液(pH10)に溶解されたフェノールフタレインモノホスフェート(1mg/ml)であった。

正の対照(ポリエチレンドロPPERボトル容量122.5ml)は、サンプル希釈液(0.05Mのトリス緩衝液、pH7.4、1%のウシ血清アルブミン(BSA)、0.15Mの塩化ナトリウム、0.02%のアジ化ナトリウム、5mMのエチレンジアミン四酢酸(EDTA)、1mMのフェニルノチルスルホンフルオリド(PHSF)及び500カリクレイン単位/mlのアプロチニン)に50mg/mlの胎児フィブロネクチンの適度に希釈された胎児フィブロネクチンを含む準水であった。このサンプル希釈液は、引用により本明細書に述べられる、1990年4月24日に公開されたアメリカ特許第4,919,889号(Jones など)に記載されている。

負の対照(ポリエチレンドロPPERボトル容量2.5ml)は、胎児フィブロネクチンを含まない正の対照のために使用されるサンプル希釈液であった。

ナリゲ緩衝液(ポリエチレンドロPPERボトル容量10ml)は、1.0Mのトリス緩衝液、pH7.4、4.0Mの塩化ナトリウム、2.5%のTween-20及び1%のアジ化ナトリウムを含む50%濃縮液であった。ナリゲ緩衝液は、アッセイに使用のために0.02Mのトリス、0.08Mの塩化ナトリウム、0.05%のTween-20及び0.02%のアジ化ナトリウムの最終濃度に水により希釈された。

キットはさらに、24個の5μlサイズのポリエチレンサンプルフィルター(Porac Technology, Fairburn, Georgia)、マイクロタイターストリップホルダー、マイクロタイタープレートカバー及び指針シートを含んだ。キットにおけるすべてのドロPPERボトルは、試薬約50μl液滴を分散するように企画されたポリエチレンボトル

であった。サンプル収集に続いて行なわれるすべてのアッセイ段階は、キットにおける試薬及び材料を利用した。

アッセイは次のようにして行なわれた。すべてのサンプルを、マイクロタイターを用いて、後方円蓋口又は子宮口近くで収集した。サンプルを、収集バイアルにおける1.0mlのサンプル希釈液に含めた。サンプル希釈液は上記の通りである。スワブを指針から取り、収集管にできるだけ液体を注した。サンプルを、通過の前又は後で、アッセイの前、15分間、アッセイキットからの封筒と共に37°Cでインキュベートした。サンプルフィルターを個々のサンプル管上の特定の位置に置いた。8-ウェルストリップを、ストリップホルダーの位置に置いた。ホルダーは、12段及び8列の標準マイクロタイタープレートの英数字指示を有した。個々のサンプル及び正及び負の対照の二重の100μlアフリコートを、マイクロタイターストリップの列々のウェルに置き、そして室温で1時間インキュベートした。

インキュベーションの後、サンプル及び対照をウェルからアスピレートした。ウェルを、希釈された洗浄緩衝液(12)により3度洗浄した。洗浄の後、100μlの酵素-抗体複合体を個々のウェルに添加し、そして室温で30分間インキュベートした。ウェルをアスピレートし、そして上記のように洗浄した。洗浄の後、100μlの酵素基質を個々のウェルに添加し、そして室温で30分間インキュベートした。

インキュベーションの後、プレートを手により又は軌道振動機により軽く揺動し、ウェル内容物を混合した。ストリップのフレームを、ELISAプレートリーダーに配置した。550nmでの個々のウェルの吸光度を測定した。個々のサンプル及び対照についての二重のウェルの平均吸光度を計算した。患者サンプルの吸光度が正の対照の

吸光度よりも低い場合、サンプルは陰性であり、これはサンプルにおける検出できないレベルの胎児フィブロネクチンを示す。サンプル吸光度が正の対照の吸光度よりも高いか、又は等しい場合、そのサンプルは陽性であり、これは胎児フィブロネクチンがサンプルに存在したことを示す。いずれかのアッセイにおいて、正の対照の吸光度が負の対照の吸光度の1.5倍以上でない場合、その結果は棄却され、そしてアッセイ方法がくり返された。

実施例10

妊娠試験

妊娠試験を行なうために、子宮頸管又は子宮口近くの腔から除去し、そして妊娠であると思われる婦人からの胎児膜阻抗原、すなわち胎児フィブロネクチンの存在を決定するためにアッセイした。試験サンプルにおける胎児フィブロネクチンを示す妊娠の20週間以降に得られたサンプルは、正常な子宮妊娠を示す。

スワブサンプルを、実施例9に記載されているようにして、393人の婦人から得た。試験された婦人のうち、50人が多胎妊娠(MP)(血清又は尿ヒト胎毛性性腺刺激ホルモン(hCG)の分析による)として確認され、333人が子宮内妊娠(IMP)(血清又は尿hCGの分析による)を有することが確認され、そして10人が子宮外妊娠(ECT)(血清、血清hCG、臨床学的試験及び手術による確認による)を有することが確認された。

アッセイを、実施例9に記載されるようにして行なった。但し次の例外が存在する。抗体複合体は、0.02Mのトリス、0.3mMのNaCl、0.05%のTween 20、5.0%のBSA、0.02%のNaHにおいて1:1,000に希釈されたヤギ抗ヒトフィブロネクチン(Jackson Immune Research Labs カタログ番号109-056-059)であった。酵素基質は、AMP緩衝液(Sigma Chemical Co.カタログ番号221)に希釈されたp

ラーニトロフェニルホスフェート(Sigma Chemical Co.カタログ番号104-107)であった。さらに、サンプルを通過よりもむしろ遠心分離し、粒状物を除去した。この試験に関しては、サンプルにいつれかの胎児フィブロネクチンを検出するアッセイが陽性試験として評点された。試験の結果10下記に示される。

集 団	TPa	FPa
MP = 50	42	8
IMP = 333	72	261
ECT = 10	3	7
妊娠 = 243	75	268

試験結果の分析は下記に示される。第1の分析は子宮外妊娠を有する婦人からの結果を包含しない。第2の分析は、子宮外妊娠を有する婦人からの結果を包含する。分析において、次の略語が使用された。"Se"は感受性を意味する(前記条件を有する婦人の合計数により割り算された正しい陽性試験結果の数;すなわち正しい陽性及び誤った陽性試験結果の合計により割り算された正しい陽性試験結果の数)。 \bar{Se} は特異性を意味する(前記条件を有さない婦人の合計数により割り算された正しい陰性試験結果の数;すなわち正しい陰性及び誤った陰性試験結果の合計により割り算された正しい陰性試験結果の数)。 \bar{PPV} とは、陽性の予測値を意味する(陽性として試験されたサンプルの合計数により割り算された正しい陽性試験結果の数)。 \bar{NPV} とは陰性の予測値を意味する(陰性として試験されたサンプルの合計数により割り算された正しい陰性試験結果の数)。

	IFn -	IFn +	
NP	42	8	50
IOP	72	261	333
	114	269	383

$$Se = 261/333 = 78\%$$

$$Sp = 42/50 = 84\%$$

$$PPV = 261/269 = 97\%$$

$$NPV = 42/114 = 37\%$$

	IFn -	IFn +	
NP	42	8	50
妊娠	75	268	343
	117	276	393

$$Se = 268/343 = 78\%$$

$$Sp = 42/50 = 84\%$$

$$PPV = 268/276 = 97\%$$

$$NPV = 42/117 = 35\%$$

前記研究の結果は、陽性アッセイ結果が婦人が妊娠していることを示すことを指示した。

実施例11

子宮外妊娠試験

実施例10の方法を、同じサンプルを用いてくり返した。しかしながら、この場合、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の胎児フィブロネクチンのカットオフ（負の対照の値+2つの標準偏差）が、胎児フィブロネクチンの存在についての陽性試験結果のために使用された。データは、実施

例10の方法を、同じサンプルを用いてくり返した。しかしながら、この場合、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の胎児フィブロネクチンのカットオフ（負の対照の値+2つの標準偏差）が、胎児フィブロネクチンの存在についての陽性試験結果のために使用された。データは、実施

この研究においては、291人の婦人からの0.5mlの物質は子宮内妊娠であることが確認され、そして8人の婦人は子宮外妊娠（2人は子宮外妊娠であり、そして6人の婦人は非妊娠であった）ではなかった。結果は、下記に示される。

	IFn ≥ .11	IFn < .11	
POC	288	3	291
妊娠	0	8	8
	288	11	299

$$Se = 288/291 = 99\%$$

$$Sp = 8/8 = 100\%$$

$$PPV = 288/288 = 100\%$$

$$NPV = 8/11 = 72.7\%$$

妊娠の生成物を含むサンプルにおいては、有意な量の胎児フィブロネクチンが見出され、これは正常な妊娠の存在及びその時期を指示した。データはまた、負のアッセイ結果を有する妊娠の患者において、子宮外妊娠の可能性が示唆されることも示す。

持表平6-503645 (15)

例10に記載されているようにして分析される。感受性、特異性、陽性の予測値及び陰性の予測値は、この分析において子宮外妊娠の検出に基づかれている。

	IFn ≥ .5	IFn < .5	
非妊娠	135	198	333
妊娠	0	10	10
	135	208	343

合計妊娠数

$$Se = 10/10 = 100\%$$

$$Sp = 135/333 = 41\%$$

$$PPV = 10/208 = 5\%$$

$$NPV = 135/135 = 100\%$$

上記結果は、陽性試験結果が、婦人が子宮外妊娠を有さない高い程度の信頼性を提供することを示す。すなわち、それらのサンプルに関しては、婦人が子宮内妊娠を有することを示唆する試験結果の100%が正しかった。従って、その試験は“IOPにおける規則（Rule in IOP）”試験として特徴づけられ、特に、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の胎児フィブロネクチン濃度が子宮内妊娠を示す。

実施例12

治療用流産試験の生成物

治療用流産から得られたサンプルを試験し、胎児性物質が子宮から除去されたかを確かめた。アッセイは例9におけるようにして行なわれた。但し次の例外を伴った。サンプルを、濾られた綿を通しての水性透過により妊娠の生成物から試験管中に収量し、2000rpmで10分間、過心分離し、そして上清液を追加の洗浄を行わないで胎

実施例13

早期分娩サンディッチタイムノアッセイ

実施例10の方法を、妊娠の20-36週間で得られた試験サンプルによりくり返した。研究は、アメリカ合衆国における3種の周産期総合診療所で行なわれた。婦人を、頭の疑わしい早期分娩又は損なわれていない胎児を有する疑わしい早期分娩のいずれかのために病院への入院について評価された。

頭の破損の確認は、羊水の全体のプーリングについての胎児の試験、ニトラジン紙を用いてアルカリ性脂分泌の存在、シグナル形成のために産生された胎児分泌の胎児試験及び羊水過少症の超音波診断により行なわれた。頭の破損は、それらの4種の診断基準のうちいずれかの2つの存在により定義された。23週-36週の妊娠、最後の知られている月経期間に基づいての6日目の妊娠、及び初めの3ヵ月の骨盤試験により及び28週以下の妊娠を超音波胎理的に確かめられた出産の予定日の妊娠の損なわれていない胎児を有する117人の婦人が続いて記載される。婦人は、病歴及び子宮収縮の記録を包含する臨床試験及び子宮の試験に基づいて、早期分娩及び続く出産のために危険であることが主事医により決定された。早期分娩の臨床学的定義は確立するのに時々困難であるので、胎児フィブロネクチンの胎生学的利用性を確立するデータは、種々の結果として早期分娩を用いて分析された。

母方の血漿フィブロネクチンによる子宮腔汚染についての可能性を評価するために、母方の血液検体を、第2又は第3のトリノスターの間、明らかに胎児的な妊娠の52人の婦人から得た。羊水検体を、初期の第2のトリノスターにおいて遺伝子診断のために羊水穿刺を受ける52人の患者及び第3のトリノスター、選択的な帝王切開の術、胎児の肺の成熟の評価のために羊水穿刺を受ける8人の患者から得

た。

アッセイ結果は、第2のトリノスターでの羊水における胎児フィブロネクチンの濃度が $87.1 \pm 4.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($n=92$)であり、そして第3のトリノスターにおいては、 $27.1 \pm 17.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($n=8$)であることを示した。第2のトリノスターでの母方の血液における胎児フィブロネクチンの濃度は $1.48 \pm 0.11 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($n=20$)であり、そして第3のトリノスターにおいては $3.19 \pm 0.30 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($n=32$)であった。

	IFN+	IFN-	
PTD	49	10	59
TD	11	47	58
	60	57	117

+感受性=83.1%, 特異性=81.7%
相対的危険比=20.9 (95% CI : 8.8, 49.7) ;
 X^2 , $P < 0.01$

疑わしい早期分娩及び損なわれていない羊膜を有する117人の患者について上記表に示されるように、早期出産する(PTD)59人の婦人のうち49人(感受性=83.1%)は、出産予定で出産する(TD)58人の婦人のうち11人(特異性=81.0%)と比較して、それらの子宮腔分泌において胎児フィブロネクチンを有した($P < 0.01$)。同様に、それらの子宮腔分泌に胎児フィブロネクチンを有するそれらの患者は、子宮腔胎児フィブロネクチンを示さないそれらの婦人(負の予測値=82.5%)よりもより一層、早期出産する(正の予測値=81.7%)傾向があった。

子宮腔胎児フィブロネクチンの存在は、疑わしい早期分娩を有するそれらの婦人における早期出産についての危険性の敏感且つ特異

予測値を確認した。

	IFN+	IFN-	
PTD	20	8	28
TD	8	41	49
	28	49	77

感受性=71.4%, 特異性=83.7%
相対的危険比=12.8 (95% CI : 4.5, 36.3) ;
 X^2 , $P < 0.01$

実施例14

破壊された膜サンドイッチタイムノアッセイ

実施例9の方法を、20週の妊娠から得られた試験サンプルによりくり返した。この産科部位臨床研究の目的は、過期妊娠及び疑わしい膜の破壊を有する婦人(TROM)、早期妊娠及び疑わしい膜の破壊を有する婦人(PROM)及び損なわれていない羊膜を第3のトリノスターにおいて有する経膈の婦人(対照)の腔分泌における胎児フィブロネクチンを検出するためにイムノアッセイの効率を評価することであった。羊膜の破壊の推定上の診断は、実施例13に述べられている臨床的基準に従って行なわれた。そのアッセイ結果は、人口統計学的特徴、産科歴及びサンプル収集と出産との間の期間を包含する現在の妊娠の特別な特徴により個々のグループについて分析された。胎児フィブロネクチンが、PROMでの85人の婦人、TROMでの339人の婦人及び対照の67人の婦人から得られた子宮腔分泌において分析された。検査法により又は最後の知られた月経期間により確かめられるような既知の妊娠年齢の婦人についてのデータのみが提供されている。

次の表は、胎児フィブロネクチン結果により分類されるPROM、

的な予測物であった。それらの患者における胎児フィブロネクチンの存在は、3.79の算定回帰推定比により早期出産の危険性に強く関係した(95% CI : 2.33, 6.15; $P < 0.01$)。

母方経路の胎児フィブロネクチンにより混合する可能性について評価するために、データを、血液により汚染された31種のサンプルの排除の後に分析した。下記に示されるように、類似する割合の患者がそれらの子宮腔分泌に胎児フィブロネクチンを有し、そして早期出産した。さらに、胎児血液の存在又は不在の包含は、1.70 (95% CI : 0.91 : 3.18; $P = 0.1$)の推定比を付与する段階的な算定回帰モデルに示し、それは、血液が、胎児フィブロネクチンが胎児モデル中に導入された後、早期出産の独立した予測因子でないことを示す。しかしながら、血液により汚染された子宮腔における胎児フィブロネクチンの検出が切迫分娩のインジケータであることは単一質量分析から明白であった。

	IFN+	IFN-	
PTD	27	9	36
TD	7	43	50
	34	52	86

+感受性=75.0%, 特異性=86.0%
相対的危険比=18.4 (95% CI : 6.7, 50.4) ;
 X^2 , $P < 0.01$

PTDのための危険性の婦人を測定するためへの胎児フィブロネクチンの有益性は、2cmを超える子宮拡張と共に損なわれていない膜を有する早期分娩での婦人が分析から排除される場合でさえ、維持された。3.18 (95% CI : 1.8, 5.6, $P < 0.01$)の算定回帰推定比は、この臨床的に分類した集団における胎児フィブロネクチンの

TROM及び対照における婦人のためにサンプリング(EGAS)及び出産(EGAD)並びにサンプリングと出産との間の期間(SANDEL)で妊娠年齢(週)についての観測の回数及び平均(± 50)を示す。データはまた、サンプリングの48時間以内で生じる出産の% (% Del < 48 Hrs)及びPROMにおける早期出産の% (% PTD)も提供する。

	PROM		TROM		対照	
	IFN+	IFN-	IFN+	IFN-	IFN+	IFN-
n	80	5	319	20	13	54
EGAS (週)	32.3 (3.8)	30.4 (4.5)	39.3 (1.8)	38.9 (1.3)	38.6 (1.4)	38.4 (1.5)
EGAD (週)	32.7 (4.0)	33.5 (6.0)	39.4 (1.8)	39.9 (1.4)	39.6 (1.8)	40.3 (1.5)
SANDEL (時間)	59.0 (204)	542.0 (439)	18.1 (48)	163.4 (187)	169.3 (165)	323.4 (213)
Del < 48 Hrs	--	--	94.7	45.0	23.1	5.3
PTD	97.5	60.0	--	--	--	--

疑わしい膜の早期破壊を有するPROMの85人の患者のうち、80人は彼らの子宮腔に胎児フィブロネクチンを有し、そして早期出産した97.5% ($n=78$)は、羊膜が破壊されたことを示す。疑わしい膜の破壊を有するTROMの339人の患者のうち、319人は彼らの子宮腔に胎児フィブロネクチンを有し、そしてサンプリングの48時間以内で出産した94.7% ($n=302$)は、羊膜が破壊されたことを示す。

明らかに損なわれていない羊膜を有する対照の67人の患者のうち、13人は彼らの子宮腔に胎児フィブロネクチンを有し、そしてサンプリングの48時間以内で出産したのは23.1%であり、負の胎児フィブロネクチン結果を有する対照の婦人は5.3%であった。これらの結果は、膜の破壊の検出についての従来使用されてきた診断試験がしばしば信頼できなくなることを示唆する。さらに、陽性の胎児フィブロネクチン結果を有するすべての婦人は、陽性の胎児フィブロ

エクチン結果を有する婦人よりも有意に ($P < 0.05$) により高いサンプルからの出産の頻度を有した。

IRONにおける婦人から収集された339種のサンプルのうち、腫瘍細胞の存在に関する情報は、316人について利用できた。彼らのうち、90人(28.5%)が腫瘍細胞の存在下で収集された。EGAS, EGAD, SANDER及び% Del<48 hrsが、次の表にそれらの婦人のために示される。EGAS及びEGADは腫瘍細胞を有する及び有さない婦人に関して類似するが、腫瘍細胞を有する婦人は腫瘍細胞を有さない婦人よりもよりすばやく出産する ($P < 0.05$)。陽性結果の割合は、検体収集の時点で、腫瘍細胞の存在又は不在にもかかわらず類似する。

n	IRON	
	血液+	血液-
EGAS (Moeba)	39.3 (1.0)	39.3 (1.1)
EGAD (Moeba)	39.4 (1.1)	39.4 (1.2)
SANDER (Moeba)	12.8 (23.7)	28.1 (111)
SDel<48hrs	91.2	95.6

この分析は、産後における血液の存在が婦人のこの集団についての試験結果に対して明らかな効果をもたらさないことを示す。対照におけるたった1人の婦人が腫瘍細胞を有するものとして固定された。彼女は負のアッセイ結果を有し、そして検体収集の後、約135時間で出産した。

胎児フィブロネクチンは、羊膜の破壊を示す、羊水の検出のための最適なマーカーである。胎児フィブロネクチンは、羊水に高濃度で及び母方の血液に低濃度で存在する。子宮腔液における胎児フィ

ブロン化された0.5%非脂肪ドライミルックのブロッキング試薬を順に適用する。過剰のブロッキング試薬を、少なくとも約20分後に除去する。

第一維持装置 (Target Device, V-Tech, Poona, CA) を、アッセイ膜からのサンプル溶液の吸着剤層への流れを調節するために抗体-抗原複合体 (サンプル適用の方向における) の下に第2の多孔性層 (0.45 μ の低タンパク質-結合ナイロン, Le Prodyno, Pall) によりアセンブリする。次に、2つの多孔性膜を、1.5 ml以上の容量を有する吸着性多孔性ポリエチレン層 (Chromas, Brooklyn, NY) 上に配置し、そして装置に包含する。その装置を、乾燥剤を含む密封されたプラスチックバッグに個々にバックする。

コロイド状金を、0.16%のクエン酸ナトリウムによる0.01%のテトラクロロ金 (III) 離の還元により調製し、この調製においては、約3000の粒子を製造する。平皿に各及すれば、前記2種の溶液を90度にそれぞれ加熱する。還元溶液を、激しく攪拌しながら、金溶液に添加する。その混合された溶液を少なくとも10分間、煮沸する (100度)。

アフィニティ-付着されたヤギ抗-フィブロネクチン抗体 (実施例4に記載されるようにして調製された) を、吸着によりコロイド状金に結合した。平皿に各及すれば、上記で調製されたコロイド状金溶液を、水中で抗体 (5-10 μ g/ml) と共に混合した。混合に続いて、その混合体溶液を、5%のBSA及び5%のポリビニルピロリドン (最終濃度) の添加により安定化した。

ストック複合体を、中空繊維フィルターを用いての限外濾過により約10-12倍に濃縮した。その濃縮された複合体を、15mMのトリス、2%のBSA、0.1%のTween 20、0.2%のポリエチレングリコール、8%のポリビニルピロリドン及び0.04%のチメゾールにより適切

なレベルに希釈した。適切な濃度を、下記のようなサンプルアッセイ方法による広範囲の希釈度を用い、そして最良の結果を生成する希釈度を決定することによって決定した。

実施例15

胎児フィブロネクチンアッセイキット及び方法

もう1つの好ましい形態においては、胎児腫瘍抗原、すなわち胎児フィブロネクチンのためのアッセイキットは、次の成分を含む。このキットは、急速な抗原アッセイを行うために使用されるように企画された。

1. プラスチック製ハウジングを含んで成り、そして

(a) モノクローナル抗-胎児フィブロネクチン抗体を結合される多孔性ナイロン膜;

(b) 流れ調整システム; 及び

(c) 吸着剤層

を含むアッセイ装置、

2. タンパク質マトリックスにおけるコロイド状金-ラベルされたヤギ抗-フィブロネクチン抗体複合体、

3. 複合体再構成緩衝液、

4. 洗浄溶液、

5. 検出されたダクトンサンプル収集スリブ。

装置は次の方法により調製された。実施例6に記載されるようにして調製された2 μ lのネズミモノクローナル抗体PDC-6を、pH 6の0.01Mのリン酸緩衝液 (PBS)、0.5 mg/mlのBSAを含む0.1 Mのクエン酸緩衝液における懸濁液 (1.2 μ のナイロン, Bioelcyne-A, Pall) に適用する。同じ緩衝液中、実施例4に記載されるようにして調製されたヒト胎児フィブロネクチンから成る手続上の対照をまた、前記膜の別の領域に適用する。膜を空気乾燥した後、PBS-

なレベルに希釈した。適切な濃度を、下記のようなサンプルアッセイ方法による広範囲の希釈度を用い、そして最良の結果を生成する希釈度を決定することによって決定した。

選択された複合体再構成液を、ポリエチレンサンプル収集管に置き、そして凍結乾燥せしめる。その管を、凍結乾燥工程の間、2 μ の孔サイズのポリエチレンサンプルフィルター (Pore Technologies, Fairbairn, Georgia) により固定する。凍結乾燥された複合体を、乾燥剤を含むポウチに個々にパッケージする。

複合体再構成緩衝液は100 mMの酢酸ナトリウムである。この緩衝液は、1 mlの使い捨て管における単位用量としてパッケージされる。

洗浄溶液は、使い捨て管に単位用量としてパッケージされる水である。

キットはさらに、個々にパッケージされた抗原ダクトンスワブ及び手帳要約カードを含む。

アッセイは次の通りにして行なわれた。

1. サンプルを収集する前、ポウチから金複合体を含むプラスチック管を取り出し、スロイトを開き、そして複合体再構成緩衝液を含む管の全内容物を添加する。

2. 供給されるスワブによりサンプルを収集する。画面下での試験試験の間、管の後部腔室中にスワブを挿入し、約10秒間、くるくる回し、抗体を吸収する。すぐに、試験を行なうために進行する。サンプルは、後の試験のために貯蔵され得ない。金複合体溶液にスワブを置き、そして10-15秒間、上下運動により急速に混合する。

3. 管の内部上でスワブの先端を回すことによってそのスワブからできるだけ多くの液体を除去する。たぶん感染性物質を採取かうスワブを捨てる。

特表平6-503645 (18)

手続補正書(方式)

平成5年6月23日

4. プラスチックの管上にスボイト先端を置き、そしてすぐに、膜透過の表面上に乾燥され、通過されたサンプルの全体積を分散する。
5. サンプル液体が膜表面中に吸収された後、数滴の洗淨液を加し、そしてその結果を観察する。
6. 陽性結果は、膜の手順封固領域のみにて赤色により示される。陽性結果は、膜の試験領域及び封固領域においてピンク又は赤色の点により示される。

特許庁長官 麻生 啓 殿

1. 事件の表示
PCT/US91/09259
2. 発明の名称
胎児細胞採取の決定のための試薬及びキット
3. 補正をする者
事件との関係 特許出願人

名称 アテザ バイオメディカル
コーポレーション

4. 代理人
住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号
静光虎ノ門ビル 電話 3504-0721
氏名 弁理士(7709) 宇 井 正 一
(外4名)

5. 補正命令の日付
自発補正



6. 補正の対象
明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文
7. 補正の内容
明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文の
浄書(内容に変更なし)
8. 添付書類の目録
明細書、請求の範囲
及び要約書の翻訳文 各1通

国際調査報告

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER According to International Patent Classification (IPC) or to both International Classification and IPC: IPC Class. (Class. 8/00) 2018 31/329 Int. Cl. (Class. 8/00) 31/329	
2. FIELD OF INVENTION International Classification of Diseases (ICD) U.S. 438/7.1, 7.9; 438/842, 843, 846, 849	
3. SUMMARY OF THE INVENTION The present invention relates to a method for determining the presence or absence of a specific antigen in a sample. The method involves the use of a specific reagent and a specific assay system. The method is particularly useful for the detection of fetal cells in a sample.	
4. BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS The drawings show the results of the assay system. The results are shown in a table. The table has two columns: "Sample" and "Result". The results are shown in a table.	
5. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION The present invention relates to a method for determining the presence or absence of a specific antigen in a sample. The method involves the use of a specific reagent and a specific assay system. The method is particularly useful for the detection of fetal cells in a sample.	
6. CLAIMS 1. A method for determining the presence or absence of a specific antigen in a sample, comprising the steps of: (a) providing a sample; (b) adding a specific reagent to the sample; and (c) detecting the presence or absence of the specific antigen in the sample.	
7. REFERENCES US, A. 4,898,325 (STODOLSKA ET AL.) 14 January 1990, one column 3, lines 49-52; column 10, lines 10-15 and lines 49-55. US, A. 4,567,316 (SCHOTT) 23 August 1982, one column 3, lines 35-42. US, A. 4,152,993 (DOHSE ET AL.) 12 October 1978, one column 13, lines 20-25 and column 16.	
8. OTHER PUBLICATIONS None.	
9. STATEMENT OF THE INVENTOR I, the undersigned, declare that I am the inventor of the invention described in the foregoing summary and claims.	
10. SIGNATURE OF THE INVENTOR 11 MARCH 1992 15A/US	
11. SIGNATURE OF THE AGENT 27 MAR 1992 15A/US	